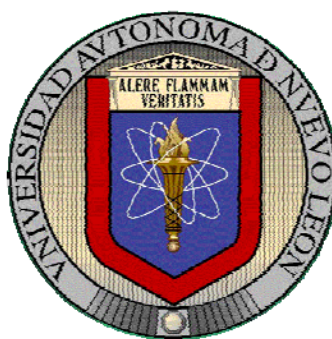


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD TERMOPROTECTORA DE
EXOMETABOLITOS EN MICROORGANISMOS
ESPORULADOS

Por

M.C. MAYRA ALEJANDRA GÓMEZ GOVEA

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. ABRIL, 2016

Actividad termoprotectora de exometabolitos en microorganismos esporulados

COMITÉ DE TESIS



Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Presidente



Dra. Luisa Yolanda Solís Soto
Secretario



Dr. Jose Santos Garcia Alvarado
Vocal



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Vocal

DEDICATORIA

A mis padres, Mario Gómez Núñez y María Alejandrina Govea Ruiz quienes me han apoyado para llegar a este punto de mi formación.

A mis tías.....

A mis hermanos.....

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Norma Laura Heredia Rojas por la confianza brindada para la realización de esta investigación.

En especial a la Doctora Luisa Yolanda Solís Soto y el Dr. Jorge Estéban de Jesus Dávila Aviña por su apoyo, paciencia, asesoramiento y en la realización de esta investigación.

ESTA INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ A CABO EN

El Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos, de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N. L., México, bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y la codirección del Dr. José Santos García A. Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto # 156073).

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. HIPÓTESIS.....	8
4. JUSTIFICACIÓN.....	9
5. OBJETIVO GENERAL.....	11
6. ANTECEDENTES.....	12
6.1 Respuesta al estrés térmico.....	12
6.2 Proteínas del choque térmico (HSP)	14
6.3 Adquisición de la termotolerancia.....	16
6.4 Microorganismos esporulados.....	18
6.5 <i>B. cereus</i>	18

6.6	<i>G. stearothermophilus</i>	19
6.7	Estrés y Esporulación	20
6.8	Metabolitos Extracelulares (Exometabolitos).....	22
6.9	ppGpp.....	24
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
7.1	Cepas bacterianas	26
7.2	Determinación de las condiciones para la inducción de termotolerancia	26
7.3	Inducción de la producción de exometabolitos en células vegetativas de <i>B. cereus</i> y <i>G.</i> <i>stearothermophilus</i>	27
7.4	Fraccionamiento de los sobrenadantes de <i>B. cereus</i>	28
7.5	Extracción y cuantificación de ppGpp	28
7.6	Cuantificación de proteínas.....	30
7.7	Producción de esporas.....	31
7.8	Ensayo estadístico.....	32
8	RESULTADOS	32
8.1	Determinación de las condiciones requeridas para inducir la adquisición de termotolerancia en células de <i>B. cereus</i> y <i>G.</i> <i>stearothermophilus</i>	33
8.2	Efecto de de exometabolitos de <i>B. cereus</i> sobre la termotolerancia	

de células de <i>B. cereus</i>	33
8.4 Inducción de la producción de exometabolitos en célula vegetativas de <i>G. stearothermophilus</i>	43
8.5 Cuantificación de ppGpp.....	47
8.6 Cuantificación de Proteínas Totales.....	48
8.7 Producción de esporas.....	51
9. DISCUSIÓN.....	54
10. CONCLUSIONES.....	59
11. BIBLIOGRAFÍA.....	60
12. TRABAJOS PRESENTADOS EN FOROS INTERNACIONALES.....	72
13. TRABAJOS PRESENTADOS EN FOROS INTERNACIONALES.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1.	Curva de muerte térmica de <i>B. cereus</i> 4810 (A) y 14579 (B) sometido a temperaturas subletales de 42° C durante 30 min y después enfrentadas a una temperatura letal (50° C durante 60 min), en medio ICC.	33
Figura 2.	Curvas de muerte térmica a 75° C de <i>G. stearothermophilus</i> 7953 (A) y 12980 (B) cultivadas en medio ICC con un tratamiento previo de 65° C durante 30 min.	34
Figura 3.	Curvas de muerte térmica a 50° C de células de <i>B. cereus</i> 4810 y 14579 en medio ICC. Un pre-tratamiento de 42° C durante 30 min fue aplicado a los cultivos.	37
Figura 4.	Curvas de muerte térmica a 50° C de las células de <i>B. cereus</i> 4810 cultivadas en medio ICC. (A) Fracción de 30 kDa con y sin exposición de la temperatura sub-letal (42° C durante 30 min) (B) Fracción de 50 kDa con y sin pre-tratamiento (42° C durante 30 min) (C) Fracción de > 50 con y sin tratamiento previo (42° C durante 30 min).	39

Figura 5.	Curvas de muerte térmica a 50° C de las células de <i>B. cereus</i> 14579 cultivadas en medio ICC. (A) Fracción de 30 kDa con y sin exposición de la temperatura sub-letal (42° C durante 30 min) (B) Fracción de 50 kDa con y sin pre-tratamiento (42° C durante 30 min) (C) Fracción de > 50 con y sin tratamiento previo (42° C durante 30 min).	41
Figura 6.	Curvas de muerte térmica a 50° C de las células de <i>B. cereus</i> 14579 en combinación con fracción de 30 kDa de <i>B. cereus</i> 4810 con y sin pre-tratamiento (42° C durante 30 min) cultivadas en medio ICC.	42
Figura 7.	Curvas de muerte de células de <i>B. cereus</i> 4810 al agregar sobrenadantes de dos cepas de <i>G. stearothermophilus</i> en una temperatura letal de 50°C en medio ICC.	45
Figura 8.	Curvas de muerte de células de <i>B. cereus</i> 14579 al agregar sobrenadantes de dos cepas de <i>G. stearothermophilus</i> en una temperatura letal de 50°C en medio ICC.	46

Figura 9.	Niveles de ppGpp en células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> 4810 sometidos a pre-tratamiento (42 ° C durante 30 min) y la temperatura letal (50° C durante 60 min), en medio ICC.	48
Figura 10.	Cuantificación de proteínas totales en células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> 4810 sometidos a pre-tratamiento (42° C durante 30 min) y la temperatura letal (50° C durante 60 min), en medio ICC.	49
Figura 11.	Curva de esporulación de <i>B. cereus</i> 4810 (azul), <i>B. cereus</i> 14579 (verde) a 37°C, <i>G. stearothermophilus</i> 7953 (morado) y <i>G. stearothermophilus</i> 12980 (rosa) a 55°C en medio de esporulación 2xSG.	51

LISTA DE TABLAS

TABLAS		PÁGINA
Tabla 1.	Valor D ₅₀ °C (min) de células de <i>B. cereus</i> al agregar sobrenadantes de pretratados y no-pretratados a diferentes tiempos.	36
Tabla 2.	Valor D ₅₀ °C (min) de células de <i>B. cereus</i> al agregar sobrenadantes de dos cepas de <i>G. stearothermophilus</i> a diferentes tiempos.	44
Tabla 3.	Concentraciones de células viables, proteínas totales y niveles de ppGpp durante pre-tratamiento (42°C por 30 min) y durante la exposición a temperatura letal (50°C).	50
Tabla 4.	Valor D ₅₀ °C (min) de esporas de <i>B. cereus</i> al agregar sobrenadantes de dos cepas de <i>G. stearothermophilus</i> .	54

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
Aw	Actividad acuosa
CONACYT	Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECS	Componentes extracelulares
EIC	Componentes de inducción extracelular
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
h	Hora
HSP	Heat Shock Proteins
ICC	Infusión cerebro corazón
kDa	KiloDaltones
Log₁₀	Logaritmo base 10
LPS	Lipopolisacárido
min	Minutos
NaCl	Cloruro de sodio
pH	Potencial de hidrógeno
ppGpp	Tetrafosfato de guanosina
RNA	Ácido ribonucleico

rpm	Revoluciones por minuto
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen-volumen
VIS	Visible
μl	Microlitros

1. RESUMEN

Los microorganismos influyen en el comportamiento de otros a través de la secreción y/o excreción de metabolitos con funciones protectoras contra condiciones de estrés a los miembros de su misma especie; sin embargo, hay poca información disponible acerca de la protección entre diferentes especies. Debido a esto, la investigación sobre la base de esta protección y su papel en la respuesta al estrés es necesaria. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los sobrenadantes pretratados y no-pretratados de *Geobacillus stearothermophilus* y *B. cereus* sobre el crecimiento vegetativo y durante la esporulación de *B. cereus* sometido a un estrés letal y la participación de ppGpp durante las condiciones de estrés. Células vegetativas y esporuladas de *B. cereus* y *G. stearothermophilus* se cultivaron hasta alcanzar la mitad de la fase logarítmica en el caso de las células vegetativas o durante diferentes tiempos correspondientes a diferentes etapas de la esporulación. Los cultivos se expusieron a estrés por calor de 65° C durante 30 min (*G. stearothermophilus*) o 42° C durante 30 min (*B. cereus*) con el fin de inducir compuestos de estrés que pudieran ser secretados y/o excretados. Los cultivos se centrifugaron, sus sobrenadantes se separaron, se transfirieron a células vegetativas y células en esporulación no-pretratadas de *B. cereus*, y posteriormente las células vegetativas fueron expuestas a 50°C (temperatura letal) y las células viables se determinaron cada 15 min por cuenta en placa en agar infusión cerebro corazón (ICC). Para las esporas, se evaluaron valores de letalidad (D) a 85, 90 y 95 ° C. El ppGpp se extrajo a partir de 200 ml de cultivos pretratados y no-pretratados y se cuantificó mediante HPLC-DAD. Los resultados indicaron que algunos sobrenadantes pretratados de *G. stearothermophilus* aumentaron la viabilidad a una temperatura letal a las células vegetativas de *B. cereus*. Sin embargo,

contrariamente a lo esperado, en general los sobrenadantes de *G. stearothermophilus* no mostraron ningún efecto sobre la resistencia al calor de las esporas de *B. cereus* a 85, 90 y 95 ° C en comparación con los controles; detectándose solamente un aumento de la resistencia al calor en algunos tratamientos seleccionados. El nivel de ppGpp aumentó cuando los cultivos detectaron un cambio en la temperatura, sin embargo no se encontró diferencia entre los tratamientos y controles. Los sobrenadantes de *B. cereus* no mostraron efecto sobre la supervivencia de células vegetativas o en la resistencia al calor de las esporas de *B. cereus*.

ABSTRACT

Microorganisms influence the metabolism of other microbes through secretion and/or excretion of metabolites with communicative functions that could provide protection against stress conditions to members of the same specie; however, little information about protection between species is available. Due to this, research about the basis of this protection and its role in stress response is necessary. The aim of this study was to evaluate the effect of stressed supernatants of *Geobacillus stearothermophilus* and *B. cereus* on vegetative growth and during sporulation on *B. cereus* subjected to lethal stress and also the participation of ppGpp in this resistance. Vegetative and sporulating cells of *B. cereus* and *G. stearothermophilus* were grown until cultures reached mid-log phase for vegetative growth or during different times corresponding to different stages of sporulation. Then cultures were exposed to heat stress of 65°C for 30 min (*G. stearothermophilus*) or 42°C for 30 min (*B. cereus*) in order to induce stress-extracellular compounds. Cultures were centrifuged, their supernatants separated, transferred to vegetative and sporulating non-stressed cells of *B. cereus*, and then the vegetative cells were exposed to 50°C (lethal temperature) for 60 min and viable cells were determined every 15 min by plate count on brain and heart infusion agar. For spores, D-values at 85, 90 and 95°C were evaluated. ppGpp was extracted from cultures exposed to sub-lethal shock and detected by HPLC-DAD.. Results indicated that some supernatants of stressed and non-stressed cultures of *G. stearothermophilus* increased viability of vegetative cells of *B. cereus* at lethal temperature. However, contrary to expected, in general *G. stearothermophilus* supernatants did not produced any effect on heath resistance to *B. cereus* spores at 85, 90 and 95°C when compared to controls, only detecting increase of heat resistance on

selected treatments. ppGpp level increases when cultures detect a change in temperature however no differences were found when compared with control. Supernatants of *B. cereus* have no effect on either the survival of vegetative cells or on the heat resistance of *B. cereus* spores.

2. INTRODUCCIÓN

El estrés es una condición adversa o amenazante a la que puede enfrentarse cualquier organismo, y que no es una condición normal para la célula. La respuesta al estrés fue descrita por primera vez en 1962 en las glándulas salivales de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, y a partir de ahí se ha encontrado en prácticamente en todas las células procariotas y eucariotas. Esta respuesta es un conjunto de mecanismos finamente regulados, dentro de lo que se encuentra el incremento de la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del estrés o proteínas del choque térmico (HSPs del inglés *Heat Shock Proteins*). Se ha reportado que las HSPs juegan un papel muy importante en la adaptación y sobrevivencia de los microorganismos ante estas condiciones, protegiendo a las células o sus estructuras por diversos mecanismos.

Diferentes mecanismos fisiológicos se han relacionado con la respuesta al estrés entre los que se encuentra la adquisición de termotolerancia, la cual se define como un proceso de adaptación de las células a temperaturas letales, causada por la pre-exposición a una condición de calor severo (subletal) más no letal. Este fenómeno ha sido estudiado en bacterias enteropatógenas como *C. perfringens* y *B. cereus*. En ambos microorganismos se ha demostrado un incremento de tolerancia de las células a temperaturas de 50°C después de ser pre-expuestas a temperaturas de 45 y 40°C respectivamente. Además se ha establecido que si un estrés subletal es aplicado a células de *C. perfringens* durante la esporulación se producen esporas más termorresistentes.

La respuesta al estrés involucra la liberación de metabolitos conocidos como “alarmonas”, exometabolitos o ESC (del inglés *Extracellular Sensing Component*) al medio, las cuales son responsables de una comunicación química activa entre células,

liberando componentes que actúan como sistemas de alarma extracelular, alertando a otras células del peligro potencial que están por enfrentar, tal como se ha determinado en *E. coli*. Se ha demostrado que al detectar una condición de estrés las ESCs liberadas se activan a componentes de inducción extracelular (EIC del inglés *Extracellular Induction Components*), lo cual ocurre sin necesidad de que estén presentes células, protegiendo a células no estresadas e induciendo mecanismos de resistencia en ellas.

Recientemente se ha establecido la importancia de exometabolitos de bajo peso molecular, particularmente autoreguladores del desarrollo en bacterias y levaduras, que han sido llamados factores di y están representados por homólogos e isómeros de alquilhidrobenzenos (AHB), como alkilresorsinol o tirosol. Se ha visto que el incremento de estas sustancias favorece la formación de estructuras latentes y resistentes a factores de deterioro. Además de éste, otro compuesto conocido como alarmona (p)ppGpp guanosin 5'-difosfato también se ha reportado ser un mediador global del control de actividades enzimáticas como el metabolismo de nucleótidos, replicación, transcripción y traducción del DNA. Esta alarmona también se ha asociado a la respuesta celular ante la deficiencia de aminoácidos y adquisición de termotolerancia en microorganismos como *Enterococcus* y *B. subtilis*. Por todo lo anterior, el entendimiento de la fisiología de esta respuesta en los microorganismos es de gran importancia ya que pudiera ayudar a entender más sobre los mecanismos de sobrevivencia de estos.

Las bacterias productoras de esporas pertenecen a la familia *Bacillaceae*, que a su vez comprende los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. *B. cereus* se encuentra frecuentemente en suelo, polvo y agua, y se ha relacionado a intoxicaciones alimentarias. La amplia distribución de estos dos microorganismos en el ambiente hace sean difíciles de controlar.

Las esporas de *B. sporothermodurans* son altamente resistentes al calor, provocando deterioro en leche cuando los procesos de pasteurización o ultrapasteurización (UHT, del inglés *Ultra High Temperature*) presentaron fallas y aunque no es patógeno para humanos, puede causar deterioro o disminución de la vida de anaquel de productos lácteos, afectando seriamente la economía de las empresas. *Geobacillus stearothermophilus* es un bacilo móvil, termofílico y formador de esporas muy resistentes. Este microorganismo no se considera patógeno, sin embargo, al igual que *B. sporothermodurans* es deteriorante en algunos productos.

En la actualidad el control biológico en la industria alimentaria es indispensable para el aseguramiento de la inocuidad y requisito de calidad del producto final, es por ello que al enfrentar los microorganismos cambios en su ambiente, el estudio fisiológico de esta adaptación es importante. De ahí el presente trabajo.

3. HIPÓTESIS

Las moléculas producidas y excretadas por cepas de *B. cereus* y/o *G. stearothermophilus* durante su crecimiento vegetativo o en esporulación son responsables de la acción termoprotectora a células de la misma o diferente especie.

4. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento que existe sobre los mecanismos de adaptación que tienen las bacterias formadoras de esporas frente a condiciones desfavorables ha ido en aumento. La mayoría de los estudios realizados a nivel de estrés va enfocado al estudio en células vegetativas, en este trabajo proponemos analizar los mecanismos de adaptación a condiciones de estrés térmico tanto en células vegetativas como en esporas en *Bacillus cereus*. En nuestro laboratorio se ha demostrado la transferencia de resistencia al calor producido por exometabolitos (particularmente en *C. perfringens*), sin embargo, el conocimiento de los componentes y mecanismos de transferencia es muy limitado y en particular lo que ocurre a nivel de otros microorganismos esporulados tal como *B. cereus*.

La información que se obtendrá durante este estudio será de importancia para ayudar a en la inocuidad microbiológica de muchos alimentos, sobre todo de aquellos que son sometidos a condiciones “supuestamente letales” para los microorganismos y en donde continúan prevaleciendo. Es por ello que se necesitan datos más exactos y precisos para conocer los posibles mecanismos de adaptación y sobrevivencia a condiciones desfavorables, tal como el calor. Esto permitirá en un futuro cercano, poder establecer medidas adecuadas para la prevención y/o control de patógenos en estos ambientes, lo cual minimizaría las pérdidas económicas que los microorganismos causan por enfermedad o deterioro de productos. No existen actualmente reportes sobre la producción de estos exometabolitos en células en esporulación, lo cual permitirá tener un panorama más amplio de los factores involucrados en termotolerancia de las esporas y las variaciones que pueden afectar el proceso, tal como la temperatura de formación de las

mismas y si estos metabolitos son capaces de inducir termotolerancia a células de la misma especie y/o entre especies.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto protector de moléculas secretadas como resultado de un estrés subletal en *B. cereus* y/o *G. stearothermophilus* tanto en su forma vegetativa como en espora durante una condición letal.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la presencia de compuestos extracelulares con capacidad termotolerante en células vegetativas de *B. cereus* y *G. stearothermophilus* durante la exposición a la temperatura letal
2. Determinar el papel del ppGpp en la inducción de termotolerancia de células de *B. cereus* durante la exposición a temperatura sub-letal y letal.
3. Determinar el efecto de los compuestos excretados por las células vegetativas de *G. stearothermophilus* sobre la termotolerancia de células vegetativas y esporas de *B. cereus* sometidos a temperatura letal.

6. ANTECEDENTES

6.1 Respuesta al estrés térmico

Las bacterias rara vez se encuentran bajo condiciones óptimas de crecimiento en un ambiente natural, por lo que con frecuencia enfrentan condiciones adversas, lo que se traduce en un estrés bacteriano (Segal y Ron, 1998; Hengge-Aronis, 2002). Para sobrevivir a los cambios que ocurren en su medio circundante, las bacterias pueden monitorear y así modificar la expresión de sus genes cuando éstos son expuestos a factores tales como variaciones en la temperatura, pH, actividad osmótica, niveles de oxígeno y fuentes de nutrientes (Vorob'eva et al. 1998; Li J-s et al. 2011; Periago et al. 2002; Shenhar et al. 2009), estos cambios le permiten a la célula sobrevivir y adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Gómez, 2006).

Los cambios que manifiesta una bacteria frente a una condición de estrés es una respuesta universal que se encuentra conservada en todos los organismos, se puede considerar como una respuesta de supervivencia que tienen los organismos frente a condiciones adversas y a su capacidad para detectar y responder a los cambios que suceden en su entorno (Schumann, 2003).

Son muchos los factores con los que las bacterias tienen que lidiar durante su crecimiento para poder sobrevivir, siendo las variaciones de temperatura las condiciones más comunes a las que se enfrentan. De ahí la importancia que tiene la respuesta de estos microorganismos frente a dichas condiciones dentro de los procesos de control (O'Connor et al. 2009).

El control de calidad aplicado con mucha frecuencia a alimentos se basa en la utilización de tratamientos combinando diversas técnicas de preservación, en donde la mayoría de las veces se utilizan tratamientos térmicos (Periago, et al. 2002). Dentro de estos tratamientos, los microorganismos que se encuentran en el alimento sufren algunas alteraciones en su ambiente de crecimiento, que tienen un impacto esencial en el comportamiento futuro del microorganismo (den Besten, et al. 2006).

El mecanismo de adaptación mejor estudiado hasta ahora en las bacterias es la respuesta al estrés térmico, también llamado choque térmico (O'Connor et al. 2009). Esta respuesta se describió en 1962 en estudios realizados en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* en donde fue detectado un dramático cambio en la actividad genética de los cultivos, inducida por un incremento de varios grados por arriba de la temperatura óptima de crecimiento, pero por debajo del nivel de temperatura letal lo cual fue considerado un choque térmico subletal (Rossi y Guagliardi, 2009).

En el caso de la respuesta al estrés térmico, las bacterias responden con la activación de una serie de genes que codifican principalmente para la síntesis de chaperonas y proteasas (Shenhar et al. 2009). Además, como respuesta a las variaciones de temperatura se ha observado que células de *B. subtilis* y *E. coli* pueden modificar la expresión de sus genes en un 10% (Li J-s et al. 2011; Price et al. 2001; Hecker et al. 1996; Helmann, J.D. et al. 2001).

La mayoría de las bacterias responden entonces a los cambios exteriores a fin de asegurar su sobrevivencia en el ambiente en que se encuentran; para el caso de las bacterias formadoras de esporas, la respuesta al estrés puede ser una alternativa esencial

cuando no encuentran las condiciones ideales para lograr el proceso de esporulación, debido a la baja densidad celular o a las condiciones de estrés en las que se encuentran (Petersohn et al. 2001).

6.2 Proteínas del choque térmico (HSP)

Todos los organismos presentan una respuesta similar cuando son sometidos a un cambio rápido en su entorno; si las células son confrontadas a un incremento de temperatura, estas responden similarmente incrementando rápidamente los niveles de un grupo selecto de proteínas que son llamadas “proteínas del choque térmico” (HSP, *Heat Shock Proteins* por sus siglas en inglés) (Asha y Bhagyalakshmi, 2011; Schön y Schumann, 1993).

Las HSP, son un grupo de proteínas que se encuentran en todas las células y cuya expresión incrementa cuando las células son expuestas a temperaturas elevadas u otro tipo de estrés. Se ha demostrado que como resultado de la inducción de los genes del choque térmico, existe un incremento en la síntesis de HSP de 1 a 20% y dicho incremento tiene una regulación transcripcional (Petersohn et al. 2001; Asha y Bhagyalakshmi, 2011).

Existen diversos estudios sobre la respuesta al choque térmico por parte de las bacterias, varios de los cuales surgen a partir de la identificación de algunas proteínas de estrés térmico. La respuesta clásica que tienen las bacterias incluye la síntesis de ciertas proteínas tales como las chaperonas moleculares: HSP100, HSP90, DnaK (HSP70), DnaJ (HSP40), GrpE (HSP23), y HSP20; y las chaperoninas GroEL/GroES que se encargan del plegamiento adecuado de proteínas que fueron dañadas (O'Connor et al. 2009; Mogk et al. 1997).

Dentro de las HSP se conocen tres clases: clase I que incluye proteínas específicas del choque térmico como DnaK, GroEL, ClpP, RsbV, HSP16.4, YfiT, PpiB y TrxA producto de los operones *dnaK* y *groESL* que se ha comprobado que en *E. coli* confieren cierta protección frente a cambios de temperatura ya que poseen una región genética conservada que está implicada en la inducción de genes del choque térmico y en la tolerancia al estrés (Browne y Dowds, 2001; Koch et al. 1998; Hecker et al. 1996; Kruger et al. 1994).

En el caso de *G. stearothermophilus* se demostró la homología de los genes *groES* y *groESL* identificando la presencia de ciertas proteínas involucradas en la adquisición de termotolerancia al ser expuesto a una temperatura de 65°C las cuales fueron denominadas como H5 hasta H12 (Wu y Welker, 1991).

Con respecto a *B. cereus*, Periago *et al* en el 2002 reportaron la detección de 31 proteínas entre las cuales se encontraban: CspB, CspE, y SodA las cuales se han involucrado en la respuesta al estrés; en tanto que SpoVG y AldA son proteínas de esporulación y proteínas del choque térmico pertenecientes a la clase I.

Los genes que codifican para proteínas de clase II (*sigB*, *ctc*, *gsiB*, *gspA*, *katE*, *gspB*, *gtaB*, entre otros) son dependientes del factor sigma alternativo, σ^B y su expresión es inducida por choque térmico y por otras condiciones de estrés como la exposición a sal, etanol o a la ausencia de glucosa, fosfato u oxígeno (Delumeau et al. 2004; Hecker y Völker, 1990; Benson y Haldenwang, 1993).

Los genes que codifican para ciertas proteasas/chaperoninas como ClpC, ClpP, FtsH o Lon pertenecen a otro grupo de HSP clasificándolos como genes de clase III; y

pueden ser inducidos por varios estímulos incluyendo el estrés por calor en ausencia del factor σ^B (Elsholz et al. 2010; Hecker et al. 2007). Las proteínas Clp poseen una actividad de ATPasa, tienen una función molecular de chaperonas y están involucradas en la regulación de la proteólisis ATP-dependiente. Proteínas de este tipo se han encontrado en microorganismos como *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *S. pneumoniae*, *Bacteroides nodosus*, *Mycobacterium leprae* y *Rhodopseudomonas blastica* y en algunos eucariotas, incluyendo a *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma brucei* y *Lycopersicon esculentum* (Kruger et al. 1994).

6.3 Adquisición de la termotolerancia

Un organismo experimenta un choque térmico cuando la temperatura de su ambiente rápidamente se incrementa por encima de los niveles óptimos de temperatura. La magnitud del cambio de temperatura que se tiene por exposición a un choque térmico varía de organismo a organismo. Sin embargo, la respuesta al estrés térmico por lo general tiene ciertas características universales que se ven reflejadas en su transcriptoma y proteoma (O'Connor et al. 2009).

Cuando es aplicado a un organismo un tratamiento térmico por arriba de la óptima de crecimiento, se puede inducir resistencia hacia un tratamiento térmico subsecuente, que pudiera ser a una temperatura letal para los organismos que no han estado expuestos previamente a un choque térmico subletal previo; a este fenómeno se le conoce como termotolerancia (O'Connor et al. 2009; Peragio et al. 2002)

Durante la pasada década este tipo de adaptaciones se han estudiado y caracterizado en diferentes especies de bacterias, entre las que podemos mencionar a

Listeria monocytogenes, *Shewanella oneidensis*, *C. perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *E. coli*, *B. subtilis* y *B. cereus* (Heredia et al. 1997, Setlow, 2006; Murata, et al. 2011; Periago et al. 2002; Rowbury, 2000; den Besten et al. 2006; Shenhar, et al. 2009).

En el caso de *E. coli*, la respuesta al choque térmico consiste en la inducción de más de 20 proteínas, la mayoría de las cuales tienen actividad de chaperoninas moleculares, que ayudan al plegamiento adecuado de las proteínas o juegan un papel de proteasa degradando proteínas mal plegadas o anormales (Gunasekera et al. 2008). Esto se detectó cuando se expuso a *E. coli* a un cambio de temperatura de 30 a 42°C lo que resultó en la inducción de genes del choque térmico, los cuales eran regulados por un factor de transcripción llamado factor sigma σ^{32} (Shenhar et al. 2009).

La respuesta al choque térmico en *B. subtilis* se ha estudiado desde los años 80's en donde se comprobó la existencia de al menos 12 proteínas (14KDa a 97KDa) que aparecen inmediatamente después del estímulo térmico; y que persistieron por lo menos 40 min después de la aplicación del estrés (Streips y Polio, 1985).

Otros estudios sobre la inducción de termotolerancia han demostrado que la respuesta que tiene *Lactobacillus bulgaricus* al ser sometida a una temperatura 10°C mayor de su óptima de crecimiento, es dependiente de la edad de las células y el grado de exposición al calor (Teixeira et al. 1994).

Para el caso de *Streptococcus thermophilus* cuyo rango de temperatura de crecimiento va de 20 a 52°C, se observó la inducción de termotolerancia a 58°C por 30 min, si antes las células eran sometidas a un pre-tratamiento de 52°C por 15 o 30 min. Esta

adquisición de termotolerancia se vio reflejada en la expresión de al menos 22 proteínas del choque térmico después de la exposición a altas temperaturas (Auffray et al. 1995).

Directamente con *B. cereus*, uno de nuestros organismos de interés, Periago *et al*, 2002 demostraron que al exponer a células vegetativas a una temperatura de 42° durante 1 h, se lograba tener una adaptación de este microorganismo a una temperatura letal de 50°C.

En nuestro laboratorio se ha trabajado con la inducción de termotolerancia de *C. perfringens* al someter a este microorganismo a una temperatura subletal de 50°C por 30 min, adquiriendo y manteniendo la tolerancia a 55°C durante 2 horas después de la aplicación del tratamiento (Heredia et al. 1997).

6.4 Microorganismos esporulados

Los bacilos representan una excelente clase de microorganismos para estudiar la respuesta al choque térmico ya que este género comprende a microorganismos Gram positivos, que pueden crecer en un rango de temperatura amplio, que tienen la capacidad de esporular y se encuentran ubicuamente en el ambiente. Además, dentro de este grupo de microorganismos se encuentran cepas de importancia médica e industrial (Streips et al. 1985). Los bacilos productores de esporas pertenecen principalmente a la familia *Bacillaceae* que comprende los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

6.5 *B. cereus*

B. cereus es un microorganismo aerobio Gram positivo causante de deterioro de los alimentos y de intoxicación alimentaria. Este microorganismo es ubicuo en el suelo,

puede encontrarse en heces de animales y en bajo grado como contaminante en productos de leche pasteurizada. Tiene una temperatura mínima de crecimiento de alrededor de 4°-5°C y una máxima de 48° a 50°C. Las toxinas producidas por las células vegetativas son agentes causantes de 2 tipos de enfermedades gastrointestinales: el síndrome emético y el síndrome diarreico. Este último es causado por una enterotoxina termolábil producida en el intestino, mientras que el síndrome emético es asociada a una toxina termoestable llamada cereulida producida en el alimento (den Besten et al. 2006).

La presencia en diferentes ambientes hacen que este microorganismo sea difícil de controlar, por eso la razón del estudio de la resistencia de sus esporas. Esto nos ayudará para que su control se lleve a cabo de una manera efectiva.

6.6 *G. stearothermophilus*

Esta bacteria anteriormente conocida como *Bacillus stearothermophilus*, pertenece a la familia *Bacillaceae*, e incluye bacilos móviles, formadores de esporas termorresistentes, Gram positivos, con capacidad de crecer en forma aerobia o anérobica facultativa (Nazina et al. 2001). Es una bacteria termófila, ya que el rango de temperatura para su crecimiento oscila de 37 a 75°C, siendo el óptimo de 55 a 64 °C (Nazina et al. 2001).

Este microorganismo no se considera patógeno, ya que no se ha reportado como agente causal de enfermedades en el hombre o animales, sin embargo, produce daños económicos considerables al ser un microorganismo deteriorante en algunos productos. Esta capacidad se debe, en parte, a que puede contaminar muchos ambientes por su potencial para formar esporas (Burges et al. 2010).

Las esporas de *G. stearothermophilus* son las formas bacterianas de mayor termotolerancia y son encontradas ampliamente en el agua y el suelo. Debido a su alta termotolerancia, dichas esporas son usadas para determinar el efecto esterilizante del proceso de pasteurización, incluyendo el UHT (Griffiths ,1995).

Los bacilos termofílicos pueden exhibir cambios en la composición y estabilidad de la membrana, termo-estabilidad de proteínas, requerimientos nutricionales, y mecanismos regulatorios entre otros, todo esto en respuesta al cambio de temperaturas de crecimiento (Wu L et al. 1991). Por lo que es importante tener información sobre este comportamiento tanto en sus células vegetativas como en sus esporas.

6.7 Estrés y Esporulación

Las esporas son resistentes a una gran variedad de agentes químicos y físicos como el calor, la luz ultravioleta, desecación, desinfectantes, etc (Beaman y Gerhardt, 1986, Setlow et al. 2006; Lee et al. 2003; Kort, et al. 2005).

Bajo condiciones limitantes de nutrientes, las células vegetativas de especies de la familia *Bacillaceae* comienzan el proceso de esporulación. Las esporas resultantes son metabólicamente latentes y muestran resistencia a diversos factores. Las esporas pueden sobrevivir cerca de cien o hasta varios millones de años, sin embargo, estas propiedades se pierden cuando comienza el proceso de germinación provocado por la presencia de nutrientes (Brown, 2000, Setlow et al. 2006; Kort et al. 2005).

Se ha demostrado que ciertas condiciones son capaces de inducir la producción de esporas más termorresistentes como lo es el aplicar choques térmicos a células en esporulación (Scheldeman et al. 2006).

Se han realizado estudios en esporas para vigilar la resistencia en calor húmedo de endoesporas de *B. subtilis*, probando la viabilidad mediante la liberación de ácido dipicolínico ya que éste es un buen determinante para el monitoreo de la resistencia en esporas (Kort et al. 2005). Al analizar células en esporulación de *B. subtilis*, se observó un incremento de la resistencia al calor cuando las células fueron previamente tratadas con un choque térmico (Movahedi y Waities, 2000).

Otros estudios han sido enfocados en la resistencia al calor por parte de las esporas, de *G. stearothermophilus* y *B. sporothermodurans* (Hornstra et al. 2009; Head et al. 2008; Ghosh et al. 2009; Olivier et al. 2011), en donde se caracterizó el efecto de la combinación de temperatura y presión en la inactivación de esporas siendo en este caso mayor la resistencia.

De la misma manera, en *B. subtilis* se comprobó que un choque térmico al inicio de la esporulación resultó en un incremento en la resistencia al calor en las esporas resultantes (Melly y Setlow, 2001).

En un estudio realizado en el 2003 por Lee *et al* se observó el efecto que tenía el choque ácido en la esporulación y como éste influía en la resistencia al calor y germinación de las esporas de *B. subtilis*. Ellos observaron que al exponer la espora a un pH de 5, la resistencia al calor se incrementaba y enzimas como la catalasa se inducían en estadios tempranos de esporulación.

En nuestro laboratorio diversos estudios se han realizado con respecto a la respuesta al estrés durante la esporulación de *C. perfringens*, en donde se estableció que cuando las esporas eran formadas a 43°C eran más resistentes al calor que aquellas que

fueron formadas a 37°C y más aún que aquellas que lo fueron a 32°C (García-Alvarado, et.al. 1992). Además, estudiando la aplicación de choques térmicos en diferentes tiempos durante el proceso de esporulación se ha encontrado que cuando éste se aplicó al inicio de la formación de las esporas, la maduración de las mismas se atrasó, no ocurriendo esto cuando el choque térmico se aplicó a la espora madura (Heredia et al. 1997).

6.8 Metabolitos Extracelulares (Exometabolitos)

Las bacterias pueden monitorear el ambiente que lo rodea y son capaces de cambiar dramáticamente la expresión de sus genes cuando son expuestos a factores ambientales tales como temperatura, pH, actividad osmótica, niveles de oxígeno y fuente de nutrientes (Nikolaev, 2008).

Actualmente, la atención se ha enfocado en el entendimiento de la capacidad que tienen los microorganismos para protegerse ante las condiciones adversas de crecimiento, siendo de suma importancia aquellas específicas que involucran la comunicación química entre células con el fin de advertir y transmitir una señal de alarma. Se ha demostrado la existencia de moléculas que son liberadas por la célula y que actúan como alarmonas extracelulares alertando a otras células de un peligro potencial (Vorob'eva 2004; Nikolaev, 2008). Estas moléculas pueden pertenecer a los compuestos alquilhidroxibenzenos (AHBs) de la clase de los alquilresorcinoles, las cuales brindan cierta protección a bacterias y otros organismos como levaduras durante la exposición a un choque térmico, estrés oxidativo, agentes químicos y biológicos (El-Registan et al. 2005; Nikolaev, 1997).

El mecanismo de acción propuesto para los AHBs es la modificación de la estructura de las proteínas por medio de su unión, generando un cambio espacial en la orientación de los grupos funcionales de la proteínas en la vecindad del centro activo dando como resultado un cambio en viscosidad y en sus propiedades hidrofóbicas dependiente de la estructura del AHBs (El-Registan et al. 2006; Nikolaev et al. 2008). La actividad protectora de los AHBs radica por lo tanto en modificar la estructura de las enzimas por medio de la formación de compuestos altamente resistentes a los factores de desnaturalización (Loiko, et al. 2009; Davydova, 2007; Davydova, 2005).

Estas moléculas han sido detectadas en microorganismos como *B. cereus*, y *Saccharomyces cerevisiae* en donde las células fueron sometidas a estrés oxidativo y estrés por calor (Konanykhina, et al. 2008; Davydova, et al. 2005; Il'inskaya, et al. 2002).

Por otra parte, la bacteria es capaz de detectar los cambios que existen en el medio circundante activando la respuesta al estrés e incrementando de esta manera los mecanismos de protección de la célula. Se ha determinado que *E. coli* al ser sometido a un estrés ácido secreta componentes extracelulares tipo sensores conocidos como Componentes Sensores Extracelulares (ESC) los cuales son capaces de detectar el estrés y activarse aun sin la presencia de bacterias en el medio a Componentes de Inducción Extracelulares (EIC) confiriéndoles cierta protección y sirviendo como alarmas a las células adyacentes que no han sufrido estrés a fin de poder prepararse para la condición adversa inminente (Rowbury, 2001).

En nuestro laboratorio se ha trabajado en el estudio de la respuesta al estrés por parte de *B. cereus* y *C. perfringens*. Se ha encontrado que los sobrenadantes de *B. cereus* son capaces de producir exometabolitos como respuesta de un estrés térmico subletal y

estos conferirían termotolerancia a células que no recibieron un choque térmico previo (Solis et al. 2003).

De la misma manera, en *C. perfringens* se detectaron exometabolitos de naturaleza proteica en células sometidas a un choque subletal. En este caso uno de dichos compuestos excretados tenía homología con la proteína del estrés GroEL (Heredia, *et al.* 2009). Está bien establecido que estas moléculas actúan como alarmonas, siendo moléculas señal que alertan a las células ante la aparición de estreses metabólicos particulares; actuando en la regulación de la expresión de genes y la actividad enzimática, equilibrando la economía metabólica en respuesta al estrés al cual se enfrenta la bacteria (Bochner, *et al.* 1984).

6.9 ppGpp

Otra alarmona conocida es el tetrafosfato de guanosina (ppGpp) que se acumula en la bacteria cuando esta sufre estrés, teniendo una respuesta mayor ante la limitación de aminoácidos, carbono y fosfato. La acumulación de esta alarmona desencadena la llamada “respuesta estricta”, lo que trae como consecuencia el decremento de la síntesis de proteínas llegando incluso a la inhibición del crecimiento de las bacterias (Ferenci *et al.* 2011; Tomoyasu *et al.* 2006, Condon et al. 1995) ya que en conjunto con el factor sigma, el ppGpp controla la interacción de la RNA polimerasa y los promotores traduccionales bajo la condición de estrés (Ferenci et al. 2011). La unión del ppGpp a la RNA polimerasa produce una inhibición de una serie de genes y estimula la transcripción de otros (Nadratowska-Wesołowska et al. 2010; Tomoyasu et al. 2006).

La acumulación de ppGpp está regularmente acompañada por la acumulación de (p)ppGpp, cuando el microorganismo se encuentra en presencia de condiciones

estresantes. El (p)ppGpp es sintetizado de GDP o GTP por la enzima producto del gen *reIA* (Abranches, *et al.* 2009; Tomoyasu *et al.* 2006; Artsimovitch *et al.*,2004).

La presencia de este nucleótido se ha demostrado en *G. stearothermophilus*, al observar su acumulación ante un decremento de aminoácidos; donde las enzimas responsables de esta acumulación fueron identificadas como (p)ppGp sintetasa I y II (Fehr y Richter,1981).

Recientemente en *E. coli* se demostró que este nucleótido modificado desempeña un papel clave en la coordinación de las respuestas celulares a las condiciones ambientales adversas a las que se enfrenta (Balsalobre, 2011).

Por todo lo anterior, se pretende identificar la presencia de exometabolitos capaces de conferir termotolerancia a células que no se han enfrentado a un estrés previo con el fin de encontrar evidencia sobre su participación en la respuesta al choque térmico y sobre todo obtener mayor información sobre la adaptación de los microorganismos esporulados. Cabe mencionar que no existen actualmente reportes sobre la producción de estos exometabolitos en células en esporulación, lo cual permitirá también tener una perspectiva sobre los factores involucrados en la termotolerancia de las esporas y las variaciones que puedan afectar el proceso.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas

En esta investigación se emplearon las cepa de *B. cereus* 4810 donada por el Dr. Reginal Bennet de la Food and Drug Administration (FDA) de E.U.A, *B. cereus* ATCC 14975 y 4810, *G. stearothermophilus* ATCC 12980 y 7953 adquirida del *Bacillus* Genetic Stock Center. Para la activación se tomó una alícuota del cultivo de reserva de Infusión Cerebro-Corazón (ICC, BD Bencton Dickinson, México) en agar inclinado y se inoculó en 5ml de caldo ICC incubándose a 37°C por 24 h para *B. cereus* y *G. stearothermophilus* a 55°C durante 24-48 h.

7.2 Determinación de las condiciones para la inducción de termotolerancia

Para realizar la determinación de la inducción de la termotolerancia en *B. cereus* y *G. stearothermophilus*, a partir de 2 tubos con 10 ml de medio ICC previamente inoculados al 1% (v/v) con las cepas activadas, se incubaron por 4 h a 37°C para *B. cereus* y 5 h a 55°C para *G. stearothermophilus* (mitad de la fase logarítmica). Se tomó uno de los tubos de cada cepa y se sometieron a un tratamiento térmico a una temperatura por arriba de su temperatura óptima de crecimiento, en tanto que el otro tubo se mantuvo a 37°C o 55°C respectivamente. Después de esto, se prosiguió a someter ambos tubos de cada cepa a una temperatura letal de 50°C para *B. cereus* y a 75°C para *G. stearothermophilus* y fueron tomadas alícuotas a los 0, 15, 30, 45 y 60 min, a las cuales se les realizaron diluciones decimales y fueron sembradas por difusión con agar ICC, e incubadas a 37°C y 55°C por 24 h.

7.3 Inducción de la producción de exometabolitos en células vegetativas de *B. cereus* y *G. stearothermophilus*

Esto se realizó de acuerdo a lo reportado por Heredia *et al* (2008) para *C. perfringens* y por Solís (2003) para *B. cereus* (4810 y 14579), lo cual se describe brevemente a continuación. Se utilizaron las condiciones previamente encontradas de inducción de termotolerancia. Se crecieron las cepas en 4 tubos con 10 ml de caldo ICC hasta que las células alcanzaron la mitad de la fase logarítmica (4 h para *B. cereus* y 5 h para *G. stearothermophilus*), dos tubos fueron sometidos a un choque térmico subletal (42°C/ 30 min para *B. cereus* y 65°C/ 30 min para *G. stearothermophilus*), mientras que los otros dos tubos permanecieron en el baño de agua a condiciones normales (37°C). Después del pre-tratamiento, los cultivos se centrifugaron (3,000 x g, en una centrífuga Eppendorf 5810R) durante 15 min a temperatura ambiente (25±2°C). Para determinar el papel de los compuestos extracelulares en la termotolerancia de las células expuestas a temperatura letales, los sobrenadantes y las células de los cultivos tratados previamente fueron separados con cuidado y luego combinados resultando 8 combinaciones: 1) células *B. cereus* pre-tratadas + sobrenadantes de *B. cereus* (control positivo), 2) las células de *B. cereus* no pre-tratados + sobrenadante no pre-tratados de *B. cereus* (control negativo), 3) células de *B. cereus* pre-tratadas + sobrenadantes de *B. cereus* no pre-tratados, 4) células de *B. cereus* no pre-tratados + sobrenadante pre-tratado de *B. cereus*, 5) células no pre-tratados *B. cereus* + sobrenadantes no pre-tratados de *G. stearothermophilus* 7953 6) células de *B. cereus* no pre-tratados + sobrenadantes pre-tratados *G. stearothermophilus* 7953, 7) células pre-tratados de *B. cereus* + sobrenadantes no pre-tratados de *G. stearothermophilus* 12980, y 8) células no pre-tratadas de *B. cereus* + sobrenadantes pre-

tratados de *G. stearothermophilus* 12980. Todas las combinaciones fueron expuestas a 50°C en un baño de agua. La viabilidad celular se determinó tomando alícuotas a 0, 15, 30, 45 y 60 min y la determinación de unidades formadoras de colonias en agar ICC y una incubación a 37°C durante 24-36 h. Los valores de letalidad (D, minutos necesarios para disminuir las células viables 1 log a la temperatura analizada) se determinaron en dos intervalos: de 0 a 5 min y de 15 a 60 min.

7.4 Fraccionamiento de sobrenadantes de *B. cereus*

Dado que en algunos tratamientos se observó la inducción de termotolerancia, se realizó el fraccionamiento de sobrenadantes de *B. cereus*, para tratar de caracterizar el/los compuesto(s) responsable(s) de dicha actividad. Los sobrenadantes de *B. cereus* 4810 y 14579 sometidos o no al choque térmico, se fraccionaron utilizando filtros de centrifugación Centriprep de 30K y 50K (Millipore), resultando sobrenadantes con moléculas menores a 30kDa y otra fracción con menores a 50kDa. Las fracciones separadas fueron agregadas a células centrifugadas de *B. cereus* 4810 y 14579 que se encontraban a mitad de la fase logarítmica y que no recibieron el pre-tratamiento térmico. Estos cultivos fueron sometidos a 50°C como fue descrito anteriormente y se evaluó el número de células que continuaron viables a lo largo del tiempo a dicha temperatura.

7.5 Extracción y cuantificación de ppGpp

Para evaluar la participación de compuestos intracelulares en la respuesta de termotolerancia, se determinaron los niveles de ppGpp en células de *B. cereus* esto se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Takahashi et al. (2004) en donde se partió de células vegetativas pretratadas y no-pretratadas, durante el pre-tratamiento y en

la exposición a la temperatura letal. Al finalizar todos estos periodos, las células se centrifugaron durante 20 min a 4,000 x g a 4°C. Se colectó el paquete celular y se concentró por liofilización. El material fue disuelto en 1 M de ácido fórmico (Sigma Aldrich México), manteniendo en hielo y ajustando a una concentración final de 20 mg/ml. La muestra se sometió a agitación con vòrtex por 1 min y posteriormente se dejó en hielo durante 30 min. El material insoluble fue sedimentado por centrifugación a 7,000 x g durante 7 min a 4°C (en una centrífuga Eppendorf 5810R). El nucleótido se precipitó mediante la adición de la misma cantidad del volumen total del sobrenadante recuperado con LiCl 2 M (JT, Baker), seguido por la adición de cuatro volúmenes de etanol (96%) y 4µl de K₂HPO₄ 1M frío (Sigma, Aldrich) y se dejó precipitar toda la noche a temperatura de -20°C, al día siguiente se centrifugó a 4000 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado, se lavó con 5 ml de etanol frío al 70% y se centrifugó nuevamente durante otros 20 min a 4,000 x g a 4°C. Finalmente se colectó el precipitado, que fue concentrado por liofilización y se disolvió en 400 µl de agua miliQ fría. Esta suspensión fue centrifugada nuevamente a 4,000 x g por 20 min a 4°C y los sobrenadantes se filtraron en dos ocasiones utilizando membranas de 0.45µm y 0.2µm (Mechold, Potrykus et al. 2013). La detección se realizó por cromatografía de alta presión de intercambio aniónico con un detector de matriz de diodos (Varian Prep Star Model 218). El nucleótido se separó con la columna S5 SAX 150 mm por 4,6 de Phenomenex (Sphereclone S5 SAX) y fue detectado a 252 nm con un flujo de 1 ml/min, utilizando un gradiente lineal de 0:100 a 100:0 (A:B). La muestra fue corrida durante 25 min usando el gradiente de 7 mM-KH₂PO₄ (Sigma), pH 4 con H₂PO₃ (Sigma)y KH₂PO₃ 0.5 M + NH₄SO₄ 0.5 M (Sigma) ajustado a pH 5.4 con KOH (JTBaker). Las concentraciones de nucleótido se expresaron en relación al peso seco de células medido en el momento que se tomó el

cultivo, pmol (mg/dw) (OCHI, 1986). La concentración de ppGpp presente en las muestras se calculó interpolando los resultados en una curva estándar utilizando un estándar de ppGpp (Trilink, San Diego CA).

7.6 Cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología de Ganesh y Lin (2011) con algunas modificaciones. Se tomó una alícuota (1 ml) del cultivo y se centrifugó a 10,000 g x 10 min. El precipitado se resuspendió en 1 ml de solución salina amortiguada con fosfato (pH 7.6) y fue sonicada (Microson TM, misonix ultrasonic cell disruptor) aplicando 20 kHz con pulsos de 10s x 10s durante 2 min. Después se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min para eliminar los restos celulares y las células no lisadas. Los sobrenadantes se concentraron mediante liofilización y después fueron resuspendidos en 40µl de PBS 1M a pH 7.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Se tomaron alícuotas de 100 µl de sobrenadantes o estándares de proteína (albúmina bovina) y se les agregaron 5 ml de reactivo de Bradford (azul brillante coomasie G-250, etanol 95% y H₃PO₄) y se agitaron. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 min. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6405 uv/vis spectrophotometer). La concentración de proteína presente en las muestras se calculó interpolando los resultados en una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino (BSA, SIGMA Aldrich de Mexico).

7.7 Producción de esporas

Una alícuota (1% v/v) de *G. stearothermophilus* y *B. cereus* de inoculó en tubos con caldo ICC. Los cultivos se incubaron a 37°C o 55°C (para *B.cereus* y *G. stearothermophilus* respectivamente) por 18 h. Posteriormente se tomó una alícuota (1%) y se inoculó en matraces que contenían 50 ml de medio de esporulación 2XSG (0.5% de peptona, 0.3% extracto de carne, 2% de agar, 0.1% KCl, 0.012% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 ml de 1 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 ml de 0.01 M MnCl_2 , y 1 ml de 1 mM FeSO_4 [Kapoor *et al.* 2014]) y se incubaron a 55°C durante 5 o 10 h en el caso de *G. stearothermophilus*, y a 37°C durante 120 h para *B. cereus*. En el caso de *G. stearothermophilus*, al término del tiempo señalado los cultivos se centrifugaron (3,500 x g) durante 15 min a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), se separó el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de 47 mm de diámetro con tamaño de poro de 45 μ (S-Pack filtro, Millipore, Billerica, MA).

Para determinar el papel de los compuestos extracelulares en la termotolerancia de esporas de *B. cereus*, cultivos en esporulación de *B. cereus* de 3, 6 o 12 h de incubación fueron centrifugados y el sobrenadante fue descartado. Los sobrenadantes de diferentes tiempos de *B. cereus* y *G. stearothermophilus* fueron combinados con las células, y se incubaron a 37°C durante un total de 120 h, al término de lo cual se centrifugó a 3,000 x g a 4°C durante 10 min. Las esporas fueron purificadas por centrifugación a baja velocidad (500 g durante 15 min) a 4°C y lavadas (10 a 15 veces) con agua Mili-Q fría. Finalmente las esporas fueron resuspendidas en agua, mantenidas a 2°C y fueron utilizadas en un periodo no mayor a 5 días.

La determinación de la resistencia al calor de esporas se realizó de acuerdo con Movahedi y Waites (2002). Las suspensiones de esporas de *B. cereus* se ajustaron a una absorbancia ($A_{600\text{ nm}}$) de 0.5 a 0.6, y se tomaron 1.6 ml colocándose en varillas de vidrio (0.6 cm de diámetro) que fueron selladas con calor. Los tubos se colocaron a 80°C durante 15 min para activar las esporas, y posteriormente fueron sumergidos en baños de agua ajustados a 85, 90 o 95°C. A diferentes tiempos se tomaron tubos y se colocaron en agua con hielo, se abrieron asépticamente y se realizaron diluciones decimales determinando el número de esporas capaces de germinar mediante su siembra en agar nutritivo (Difco, México) e incubando a 37°C por 48 h. Se hicieron curvas de muerte térmica de las esporas de los diferentes tratamientos. El Valor D se determinó a partir de la pendiente de la porción lineal de las curvas de supervivencia térmicas.

7.8 Ensayo estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces en experimentos separados, con tres repeticiones cada uno. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron utilizando la prueba de ANOVA y la prueba de comparación de Dunnet. Para comparar y analizar las diferencias entre los tratamientos se utilizó IBM SPSS Statistical Software versión 20.0. Las diferencias se consideraron significativas si $P \leq 0.05$.

8 RESULTADOS

8.1 Determinación de las condiciones requeridas para inducir la adquisición de termotolerancia en células de *B. cereus* y *G. stearothermophilus*.

Con el fin de comprobar la temperatura de pre-tratamiento a la que se debieran someter las células de *B. cereus* y *G. stearothermophilus* para hacer los ensayos de determinación de termotolerancia, se probaron diferentes condiciones de temperatura. Encontramos que las dos cepas de *B. cereus* utilizadas en el estudio al ser sometidas a un pre-tratamiento de 42°C por 30 min eran capaces de sobrevivir una exposición posterior de 50°C, y al compararse con el control mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) (Figura 1).

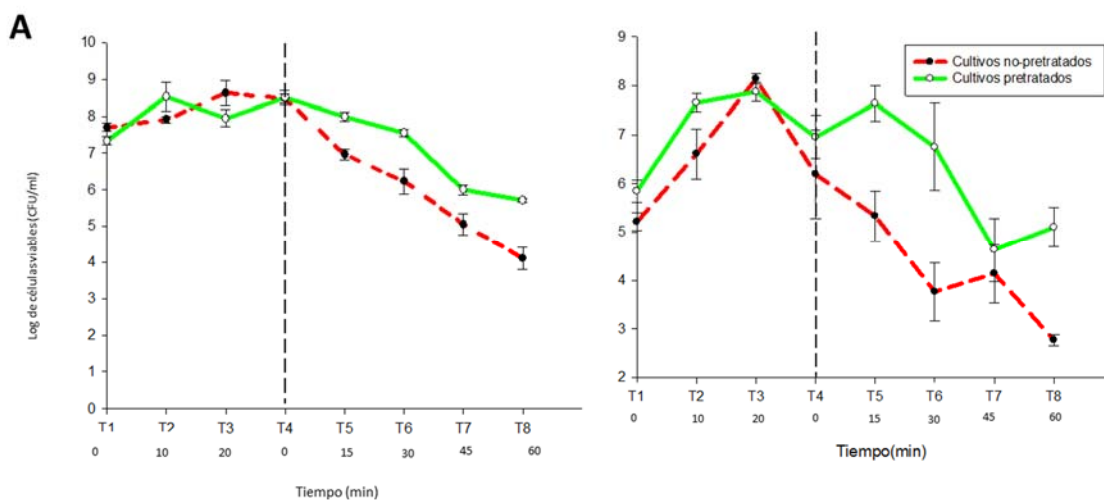


Figura 1. Número de células viables de *B. cereus* 4810 (A) y 14579 (B) sometidas a 42°C durante 30 min y después colocadas a la temperatura letal de 50°C. Línea punteada: inicio del tratamiento a temperatura letal (50°C).

Para el caso de *G. stearotheophilus* ATCC 12980 encontramos que al aplicar un estrés de 65°C por 30 min, las células fueron capaces de desarrollar termotolerancia a 75°C en comparación de aquellas que no recibieron el estrés térmico; sin embargo, la cepa 7953 no presentó la adquisición de termotolerancia a las condiciones letales antes mencionadas, comportándose entonces igual ($p \leq 0.05$) que el control que no recibió el pre-tratamiento (Figura 2).

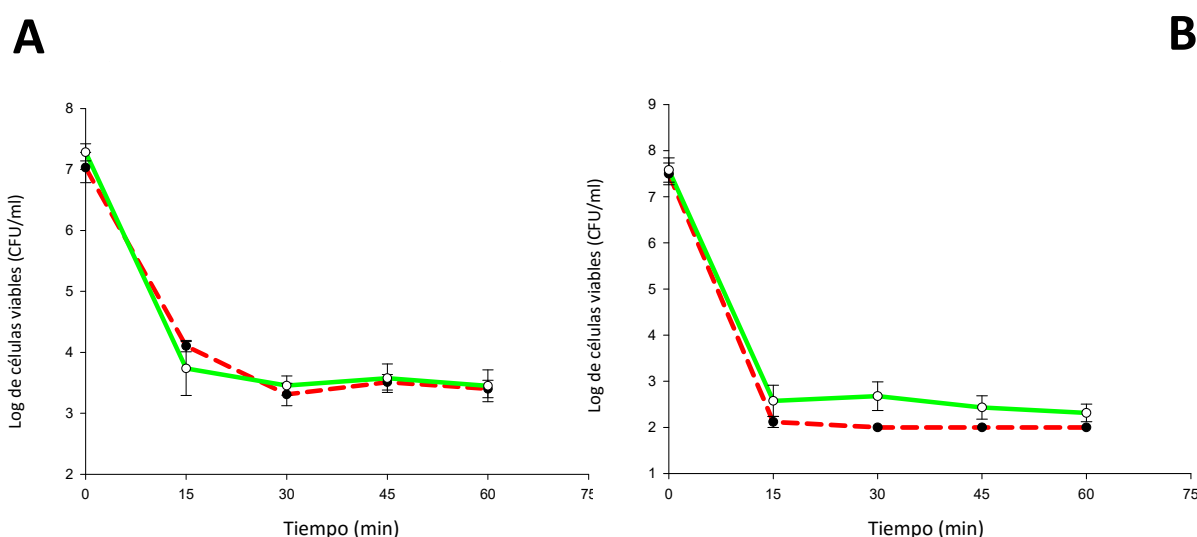


Figura 2. Número de células viables de *G. stearotheophilus* 7953(A) y 12980 (B) sometidas a 65°C durante 30 min y después colocadas a la temperatura letal de 70°C.

8.2 Efecto de exometabolitos de *B. cereus* sobre la termotolerancia de células de *B. cereus*

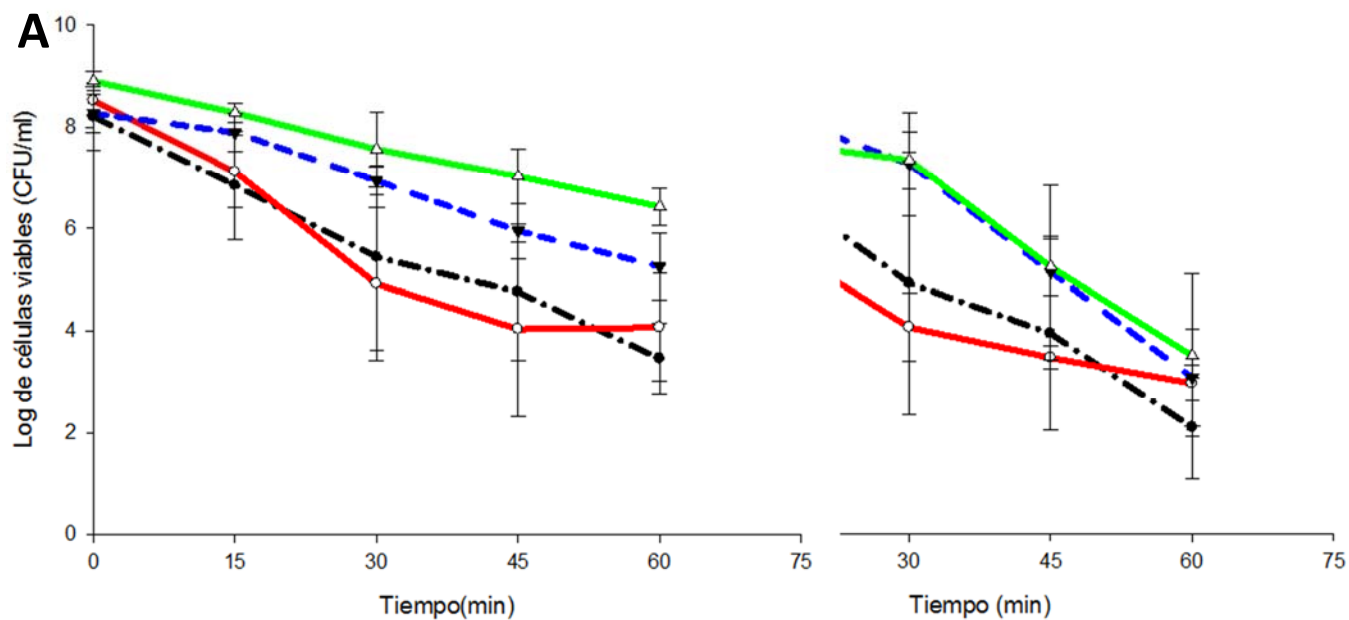
Se determinaron los valores de letalidad (D) en los intervalos 0-15min y 15-60 min de exposición a la temperatura letal. Cuando se analizó el intervalo de 0 a 15 min, en el caso de *B. cereus* 4810, en forma general se observaron diferencias entre los tratamientos

de células pretratadas de *B. cereus* + sobrenadante pretratados de *B. cereus* (Control positivo), células pretratadas de *B. cereus* + sobrenadantes no-pretratados de *B. cereus* y células no-pretratadas de *B. cereus* + sobrenadante pretratados de *B. cereus* con respecto al control negativo esto mismo se presentó para la cepa *B. cereus* 14579 (Tabla 1). A partir del minuto 15 hasta el final del tratamiento los cultivos de la cepa *B. cereus* 4810 no presentaron cambio alguno, sin embargo los tratamientos de células pre-tratadas de *B. cereus* 14579 con sobrenadantes no-pretratados de *B. cereus* 14579, células no-pre-tratadas de *B. cereus* con sobrenadantes pretratados de *B. cereus* y células y sobrenadantes pre-tratados mostraron diferencia significativa ($p \leq 0,05$) con el control negativo (células no-pretratadas de *B. cereus* con sobrenadantes no-pretratados de *B. cereus*). En la Figura 3 se puede observar las curvas de muerte que presentaron ambas cepas.

Tabla 1. Valores D (letalidad) de células de *B. cereus* al agregar sobrenadantes tratados o no-pretratados con un choque subletal de *B. cereus*.

Tratamiento	Valor D ₅₀ ^o			
	<i>B. cereus</i> 4810		<i>B. cereus</i> 14579	
	Intervalo de Valor D			
	0-15	15-60	0-15	15-60
Células no-pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadantes no-pretratados de <i>B. cereus</i> (Control negativo)	7.4 ± 0.4	17.0 ± 1.8	9.4 ± 3.9	21.7 ± 2.3
Células pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadante pretatados de <i>B. cereus</i> (Control positivo)	20.4 ± 1.8*	22.1 ± 0.9	37.6 ± 6.4*	12.3 ± 2.6*
Células pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadantes no-pretratados de <i>B. cereus</i>	45.5 ± 13.5*	19.4 ± 1.7	49.8 ± 5.5*	12.4 ± 1.8*
Células no-pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadante pretratados de <i>B. cereus</i>	12.2 ± 2.4*	23.7 ± 2.2	51.9 ± 7.8*	12.6 ± 1.8*

***Mostraron diferencia significativa (p≤0.05) cuando se compraron con el control negativo**

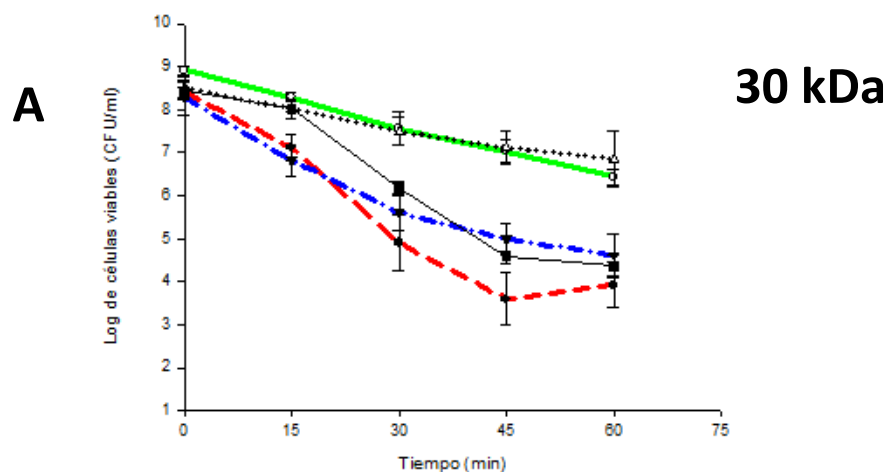


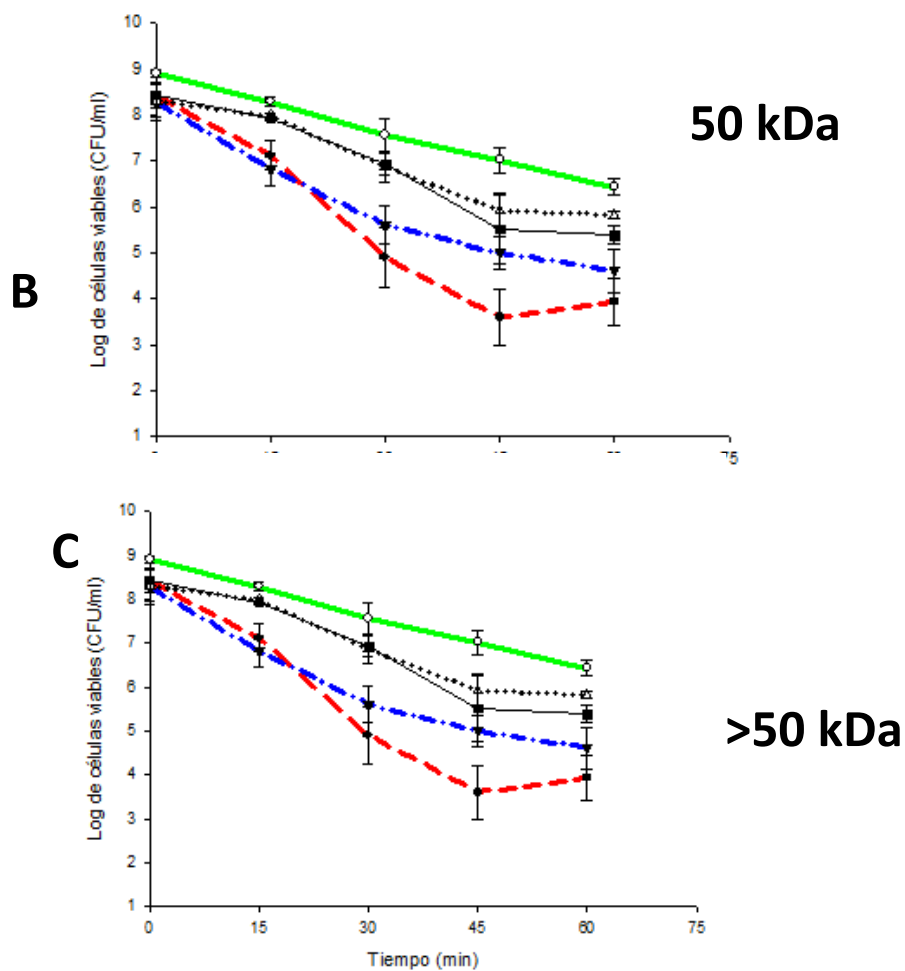
LINEA	Tratamientos
1	Células de <i>B. cereus</i> pretratados + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (CONTROL+)
2	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-pretratados (CONTROL-).
3	Células de <i>B. cereus</i> pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-tratados
4	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + sobrenadantes de <i>B. cereus</i> . pretratados

Figura 3. Curvas de muerte térmica a 50°C de células de *B. cereus* 4810 y 14579 en medio ICC. En algunos tratamientos las células o los sobrenadantes se sometieron a un pre-tratamiento de 42°C por 30 min.

8.3 Fracciones de los sobrenadantes de *B. cereus*

Debido a que algunos sobrenadantes de cultivos de *B. cereus* indujeron la adquisición de termotolerancia, se trató de aislar a las moléculas responsables de dicha acción. Se separaron los sobrenadantes pretratados y no-pretratados en fracciones de diferentes tamaños moleculares y se observó que al colocarlas a una temperatura de 50°C la fracción no-pretratada de 30kDa de *B.cereus* 4810 presentaba un efecto parecido al observado por el control positivo (células y sobrenadantes pretratados, Figura 4 A). Se observó además, que el efecto observado por esta fracción ya no fue detectado a partir del minuto 30. En tanto, las fracciones de 50 kDa y la de mayor de 50 kDa se comportaron de la misma manera, confiriendo el efecto de termotolerancia a partir del minuto 15 de estar a temperatura letal y hasta por 60 min (Figura 4 B y C).

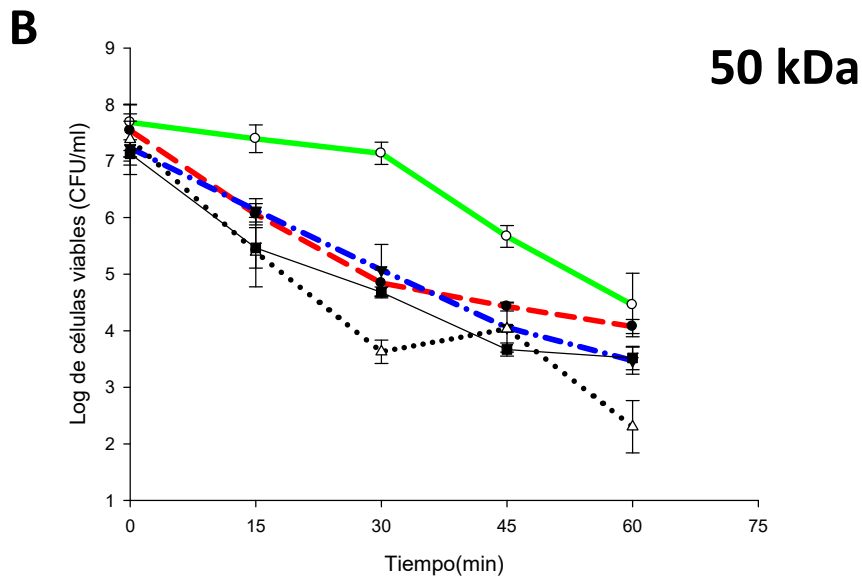
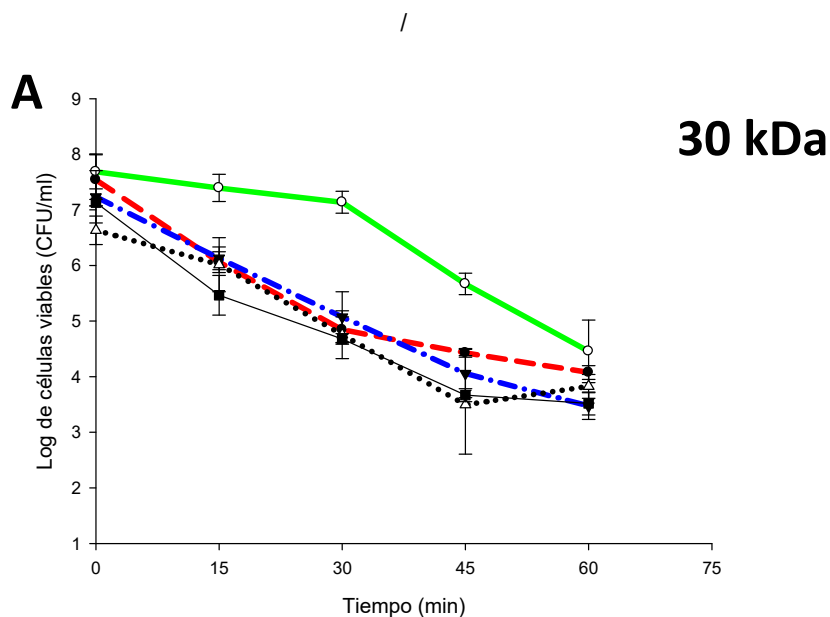


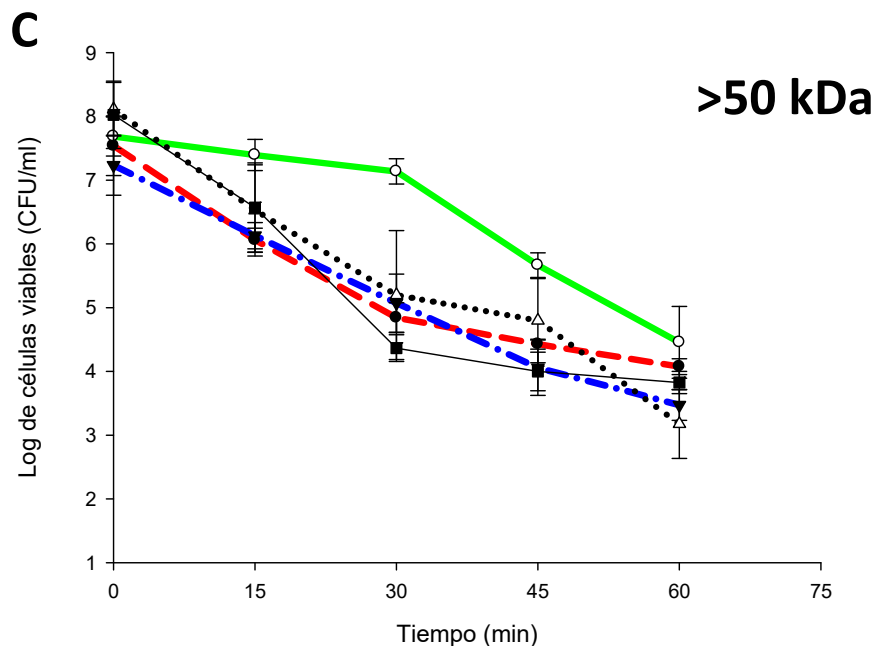


LÍNEA	Tratamientos
1 ■	Células de <i>B. cereus</i> pretratados + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (CONTROL+)
2 ■	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-pretratados (CONTROL
3 ■	-).
4 	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (FRACCIÓN
5 	COMPLETA).
4 	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + fracción no-pretratada de <i>B. cereus</i> .
5 	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + fracción pretratada de <i>B. cereus</i> .

Figura 4. Curvas de muerte térmica a 50°C de células de *B. cereus* 4810 cultivadas en medio ICC. (A) Fracción de 30 kDa con y sin pre-tratamientos (42°C/30 min) (B) Fracción de 50 kDa con y sin pre-tratamiento (42°C /30 min) (C) Fracción mayores de 50 kDa con y sin tratamiento previo (42°C/ 30 min).

Cuando se analizaron las fracciones obtenidas de la cepa 14975 no se observó efecto de protección ($p \leq 0.05$) sobre células no-tratadas de *B. cereus* cuando se expusieron a una temperatura letal.



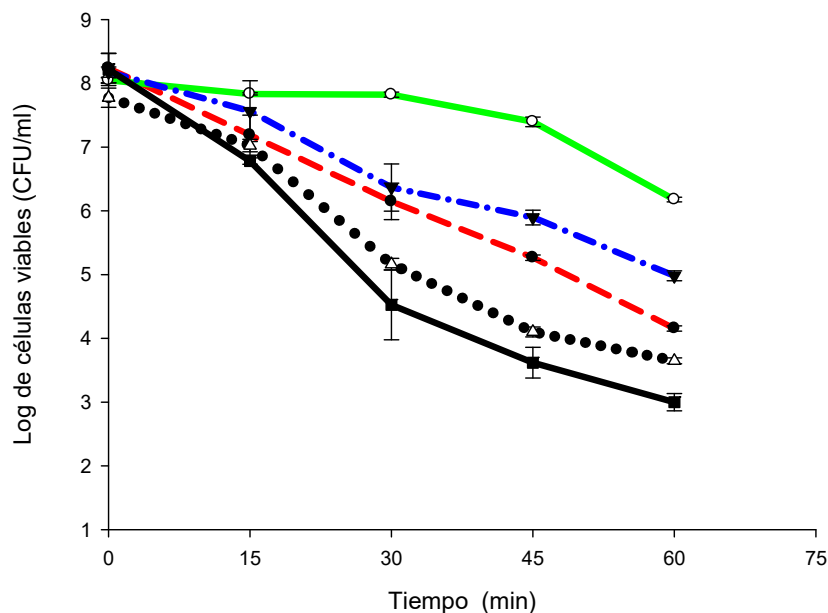


LÍNEA	Tratamientos
1 ■	Células de <i>B. cereus</i> pretratados + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (CONTROL+)
2 ■	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-pretratados (CONTROL -).
3 ■	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (FRACCIÓN COMPLETA).
4 ■	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + fracción no-pretratada de <i>B. cereus</i> .
5 ■	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + fracción pretratada de <i>B. cereus</i> .

Figura 5. Curvas de muerte térmica a 50°C de células de *B. cereus* 14579 cultivadas en medio ICC. (A) Fracción de 30 kDa con y sin pre-tratamiento (42°C/30 min) (B) Fracción de 50 kDa con y sin pre-tratamiento (42°C /30 min) (C) Fracción mayores de 50 kDa con y sin tratamiento previo (42°C/ 30 min).

La fracción de 30 kDa de *B. cereus* 4810 que fue la que mostró el mejor efecto de termotolerancia, se agregó a células de *B. cereus* 14579 no pre-tratadas a fin de establecer si la protección previamente mostrada también se podría transmitir a otros miembros de

la misma especie. Los resultados indicaron que al combinar dichas fracciones con y sin pre-tratamiento no se observó ($P \leq 0.05$) termotolerancia sobre las células analizadas, observando incluso una disminución del número de células a partir del minuto 15 de exposición a la temperatura letal (Figura 6).



LÍNEA	COMBINACIONES DE LOS SOBRENADANTES
1	Células de <i>B. cereus</i> pretratados + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (CONTROL+)
2	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-pretratados (CONTROL -).
3	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (FRACCIÓN COMPLETA).
4	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + fracción 30kda no-pretratada de <i>B. cereus</i> 4810.
5	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada + fracción 30kda pretratada de <i>B. cereus</i> 4810.

Figura 6. Curvas de muerte térmica a 50°C de *B. cereus* 14579 al agregarles la fracción de 30 kDa de *B. cereus* 4810 con y sin pre-tratamiento (42°C/ 30 min).

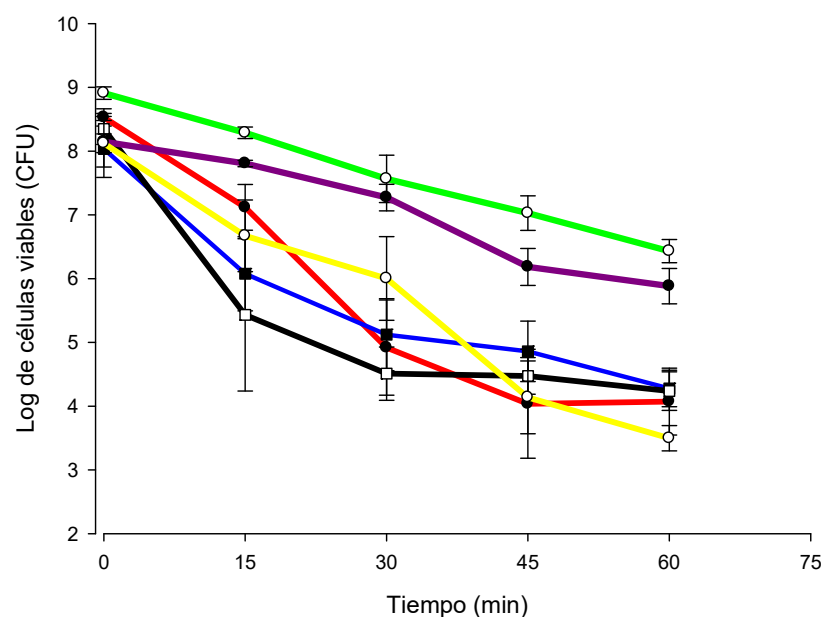
8.4 Inducción de la producción de exometabolitos con capacidad de termotolerancia en células vegetativas de *G. stearothermophilus*

Cuando analizamos el efecto de sobrenadantes de *G. stearothermophilus* sobre la termotolerancia de células de *B. cereus*, se observó efecto de termotolerancia solo en algunos tratamientos ($p \leq 0.05$) en los primeros 15 min de exposición a temperatura letal comparados con el control negativo (Tabla 2). Para la cepa *B. cereus* 4810 los tratamientos que tuvieron diferencias significativas fueron el control positivo (20.4 ± 1.8 min) y las células sin pre-tratamiento que recibieron los sobrenadantes de *G. stearothermophilus* 12980 no-pretratados (31.8 ± 15.4 min). Para la cepa *B. cereus* 14579, se observó durante los primeros 15 min el aumento de termotolerancia en los tratamientos del control positivo (37.6 ± 6.4 min) y aquellas células que recibieron sobrenadantes de *G. stearothermophilus* 12980 pre-tratados (25.7 ± 3.0 min). En el intervalo de 15 a 60 min de exposición a temperaturas letales, se observaron diferentes patrones. Las células de *B. cereus* 4810 fueron en general más resistentes ($p \leq 0.05$) a 50°C cuando se le añadieron sobrenadantes pretratados y no-pretratados de *G. stearothermophilus* (Valor $D_{50^\circ\text{C}}$ 34.4 ± 2.7 , 43.5 ± 0.6 y 26.5 ± 20.7 con respecto al control negativo 17.0 ± 1.8). En las células de *B. cereus* 14579 solo hubo diferencia en 2 tratamientos que recibieron sobrenadantes pre-tratados de *G. stearothermophilus* 7953 y no-pretratados de la cepa 12980 (97.7 ± 4.0 y 42.7 ± 6.4 respectivamente). El efecto fue más claro cuando los sobrenadantes pretratados de *G. stearothermophilus* 7953 fueron añadidos (Tabla 1).

Tabla 2. Valores $D_{50^{\circ}C}$ (min) de células de *B. cereus* al agregar sobrenadantes de dos cepas de *G. stearothermophilus*.

Tratamiento	Valor D _{50°}			
	<i>B. cereus</i> 4810		<i>B. cereus</i> 14579	
	Período de cálculo de Valor D (min)			
	0-15	15-60	0-15	15-60
Células no-pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadantes no-pretratados de <i>B. cereus</i> (Control negativo)	7.4 ± 0.4	17.0 ± 1.8	9.4 ± 3.9	21.7 ± 2.3
Células pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadante pretatados de <i>B. cereus</i> (Control positivo)	20.4 ± 1.8*	22.1 ± 0.9*	37.6 ± 6.4*	12.3 ± 2.6
Células no-pretratadas <i>B. cereus</i> + sobrenadantes no-pretratados de <i>G. stearothermophilus</i> 7953	7.1 ± 2.8	34.4 ± 2.7*	3.7 ± 0.1	18.0 ± 7.4
Células no-pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadantes pretratados de <i>G. stearothermophilus</i> 7953	3.8 ± 0.7	43.5 ± 0.60*	4.2 ± 1.0	97.7 ± 4.0*
Células no-pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadantes no-pretratados de <i>G. stearothermophilus</i> 12980	31.8± 15.4*	26.5 ± 0.7*	25.7 ± 3.0*	42.7 ± 6.4*
Células no-pretratadas de <i>B. cereus</i> + sobrenadantes pretratados <i>G. stearothermophilus</i> 12980	7.5 ± 1.4	18.2 ± 3.7	35.3 ± 6.7	20.7 ± 7.7

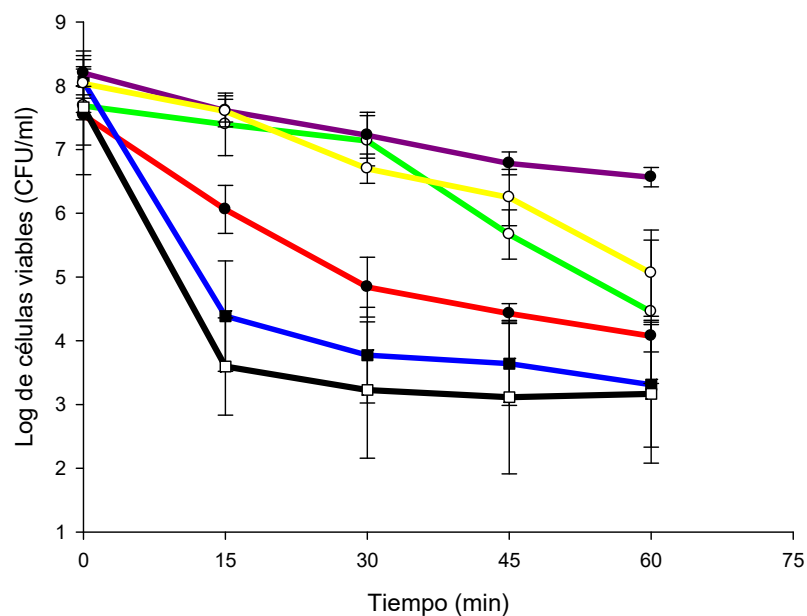
*Mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) cuando se compraron con el control



LÍNEA	Tratamientos
1	Células de <i>B. cereus</i> pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (CONTROL+)
2	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-pretratados (CONTROL -).
3	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas +sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 7953 no-pretratados
4	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 7953 pretratados.
5	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada +sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 12980 no-pretratados
6	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 12980 pretratados

Figura 7. Curvas de muerte de células de *B. cereus* 4810 al agregar sobrenadantes de dos cepas de *G. stearothermophilus* y someterlas después a una temperatura letal de 50°C.

Este mismo efecto fue observado en las células de *B. cereus* 14579, que al agregarle sobrenadantes pretratados y no-pretratados de *G. stearothermophilus* 7953 se observó la disminución ($p \leq 0.05$) de células (Figura 8).



LÍNEA	Tratamientos
1	Células de <i>B. cereus</i> pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> pretratados (CONTROL+)
2	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>B. cereus</i> no-pretratados (CONTROL -).
3	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas +sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 7953 no-pretratados
4	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 7953 pretratados.
5	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratada +sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 12980 no-pretratados
6	Células de <i>B. cereus</i> no-pretratadas + sobrenadante de <i>G. stearothermophilus</i> 12980 pretratados

Figura 8. Curvas de muerte de células de *B. cereus* 14579 al agregar sobrenadantes de dos cepas de *G. stearothermophilus* y someterlas después a una temperatura letal de 50°C.

8.5 Cuantificación de ppGpp

Dado que se ha reportado que algunos compuestos con capacidad de termotolerancia pueden ser nucleótidos, y en donde se ha especulado que un efecto protector puede ser dado por el ppGpp, en este trabajo analizamos el papel de esta molécula para conferir termotolerancia. Para esto se cuantificó el ppGpp en las células de *B. cereus* 4810 que recibieron un pre-tratamiento (42°C/ 30 min), así como cuando las células se enfrentaron a la temperatura letal (50°C/60 min). Durante el pre-tratamiento tanto el control (células de *B. cereus* no-pretratadas y siempre mantenidas a 37°C) y el cultivo pre-tratado comenzaron con una concentración inicial de ppGpp de 53.40 ± 7.92 y 49.6 ± 16 picomoles/mg de peso seco picomoles/mg de peso seco respectivamente. Después de 10 min de estar en el pre-tratamiento, se observó un incremento (65.5 ± 1.8 picomoles/mg de peso seco) en la concentración del ppGpp cuando se comparó con el control (54.0 ± 15.2 picomoles/mg de peso seco). Al finalizar el pre-tratamiento (30 min) la concentración de ppGpp se mantuvo estable (67.6 ± 7.7 picomoles/mg de peso seco), en tanto que la concentración del nucleótido decreció en el control a 46.7 ± 8.7 picomoles/mg de peso seco (Fig. 9). Cuando ambos cultivos se expusieron a la temperatura letal se observó una disminución en los niveles de ppGpp en los tratamientos y controles desde los primeros 15 min hasta llegar a una concentración final de 11.8 ± 3.4 y 17.0 ± 8.0 picomoles/mg de peso seco respectivamente (Figura 7).

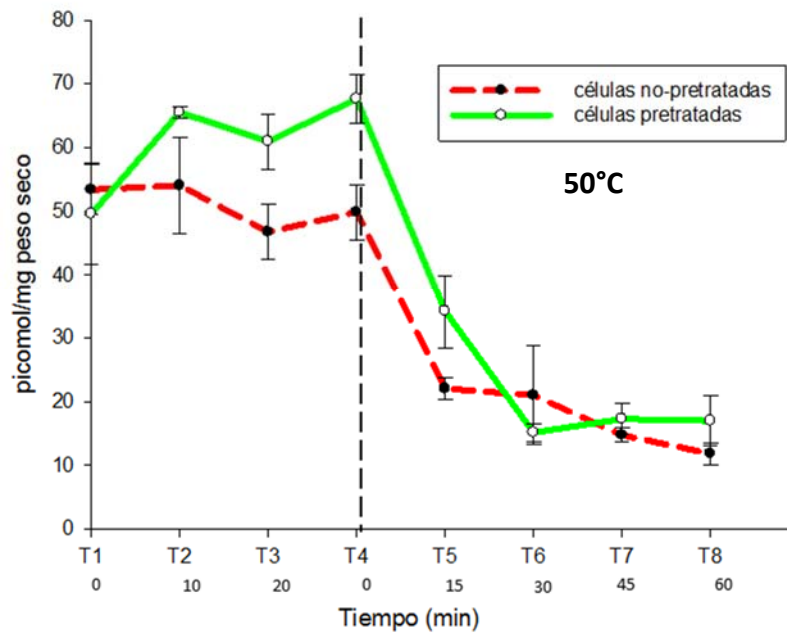


Figura 9. Niveles de ppGpp en células vegetativas de *B. cereus* 4810 sometidos a un pre-tratamiento (42°C/30 min) y posteriormente a la temperatura letal (50°C/60 min). Línea punteada: inicio del tratamiento a temperatura letal (50°C).

8.6 Cuantificación de Proteínas Totales

Cuando se analizó la concentración de proteínas en las células, no se observaron diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$) y los controles. Sin embargo, se pudo observar una disminución de proteínas tanto de las células pre-tratadas como de los controles cuando los cultivos se expusieron a una temperatura letal (Figura 10).

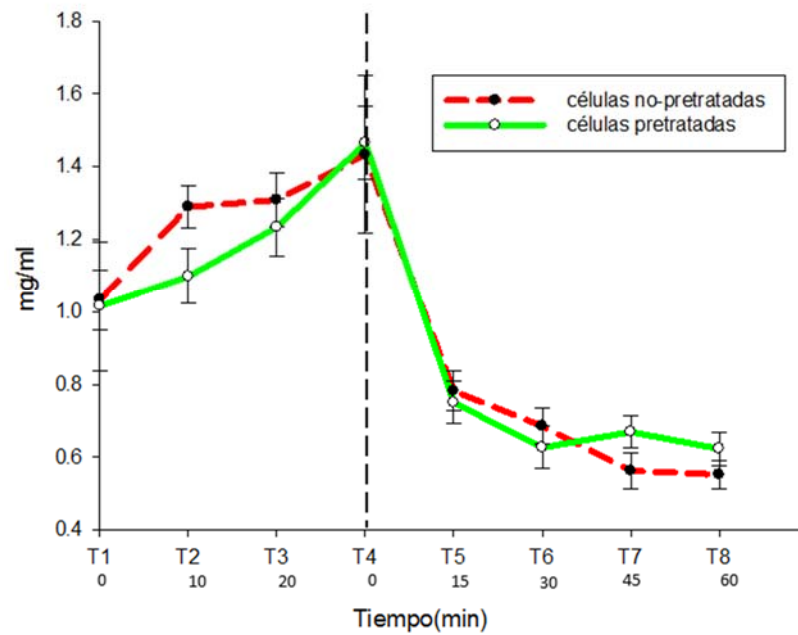


Figura 10. Cuantificación de proteínas totales en células vegetativas de *B. cereus* 4810 sometidas a pre-tratamiento (42°C/30 min) y posteriormente a la temperatura letal de 50°C. Línea punteada: inicio del tratamiento a temperatura letal (50°C).

No se observó correlación entre la concentración de proteínas, la concentración celular y la cantidad ppGpp en las células de *B. cereus* 4810 (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de células viables, proteínas totales y niveles de ppGpp en *B. cereus* durante un pre-tratamiento (42°C/ 30 min) y durante la exposición a temperatura letal (50°C).

Concentraciones							
	Tiempo	Células viables (Log/ml)		Proteínas (mg/ml)		ppGpp (picomoles/mg de peso seco)	
		No tratadas	Pretratadas	No tratadas	Pretratadas	No tratadas	Pretratadas
Durante pre- tratamiento	T1 (0 min)	7.7 ±0.1	7.3±0.1	1.0±0.1	1.0±0.4	53.4±7.9	49.6±16
	T2(10 min)	7.9±0.1	8.5±0.4	1.3.±0.1	1.1±0.1	54.0±15.2	65.5±1.8*
	T3(20 min)	8.6±0.3	7.9±0.2	1.3±0.1	1.2±0.2	46.7±8.7	61.0±8.6*
Durante temperatura letal 50°C	T4 (0 min)	8.5±0.1	8.5±0.2	1.4±0.4	1.5±0.2	49.9±8.7	67.6±7.7*
	T5(15 min)	7.0±0.1	8.0±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	22.0±3.3	34.2±11.5*
	T6(30 min)	6.2±0.3	7.5±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	21.0±15.4	15.2±2.8
	T7(45 min)	5.1±0.3	6.0±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	14.8±2.3	17.3±4.9
	T8(60 min)	4.1±0.3	5.7±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	11.8±3.4	17.0±8.0

*Existe diferencia significativa entre los tratamientos ANOVA con prueba estadística

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test n=6 significancia .050

8.7 Producción de esporas

Se realizaron curvas de esporulación en caldo 2xSG para *B. cereus* y *G. stearothermophilus* con el fin de observar si ambas cepas eran capaces de producir altos niveles de esporas en el medio. Nuestros resultados mostraron que la concentración máxima de esporas para la cepa de *B. cereus* 4810 fue a las 24 h (1×10^4 esporas/ml) la cual se mantenía hasta las 120 h; en tanto que para la cepa de *B. cereus* 14579 se obtuvieron 1×10^8 esporas/ml después de 48 h. Para la cepa de *G. stearothermophilus* 7953 se obtuvo la producción de 1×10^7 esporas/ml a partir de 24 h y de 1×10^5 esporas/ml para la cepa 12980 (Figura 11).

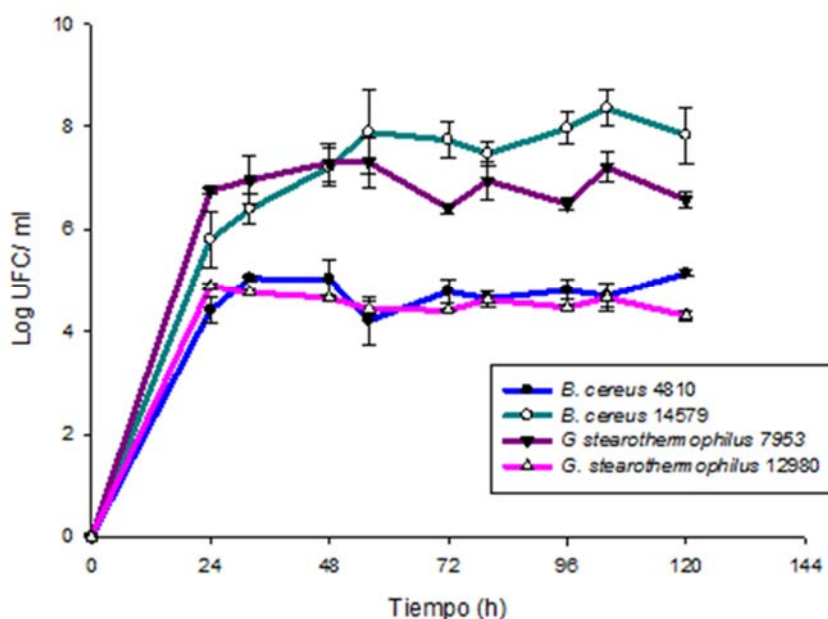


Figura 11 Curva de esporulación de *B. cereus* 4810 (azul), *B. cereus* 14579 (verde) a 37°C, *G. stearothermophilus* 7953 (morado) y *G. stearothermophilus* 12980 (rosa) a 55°C en medio de esporulación 2xSG.

A partir de estos resultados se seleccionaron los tiempos para determinar el papel de los compuestos extracelulares en la termotolerancia de esporas de *B. cereus*. Para las células de *B. cereus* se eligieron los tiempos de 3, 6 o 12 h de incubación a 37°C (correspondiente a la fase temprana, media y fase tardía de la esporulación, Schaffer, 1969) y para *G. stearothermophilus* se eligieron los tiempos de 5 ó 10 h. Se observó la disminución de la termotolerancia ($p \leq 0.05$) en las esporas de *B. cereus* 4810 a 85°C cuando los sobrenadantes de *G. stearothermophilus* pretratados y no pretratados se le añadieron a los cultivos (Tabla 2), sin embargo la termotolerancia a 90° y 95°C no se vio incrementada en los tratamientos analizados, con excepción de cuando se añadieron sobrenadantes de *G. stearothermophilus* 12980 de 10 h a células de *B. cereus* a las 12 h de incubación en donde sí se detectó la inducción de termotolerancia en las esporas ($80.8 \pm 38.6\text{min}$) cuando se compararon con el control negativo ($23.2 \pm 4.2\text{min}$).

En la mayoría de los tratamientos analizados de la cepa de *B. cereus* 14579 no se observó ningún efecto por la adición de sobrenadantes, con excepción cuando se añadieron sobrenadantes de *G. stearothermophilus* 7953 de 5 h a *B. cereus* 14579 a las 3 y 6 h de incubación, donde se detectó un aumento de termotolerancia [$D_{95^\circ\text{C}}$ 10.9 ± 0.5 y 12.0 ± 2.7 vs 5.7 ± 0.7 min del control), y los sobrenadantes a partir de 10 h que se añadieron a *B. cereus* 14579 en 12 h de incubación ($D_{85^\circ\text{C}}$ de 52.4 ± 4.9 vs $12.8 \pm 2.7\text{min}$ del control negativo y $D_{95^\circ\text{C}}$ de 16.1 ± 7.2 vs $5.7 \pm 0.7\text{min}$ del control negativo).

Tabla 4. Valores D (min) de esporas de *B. cereus* al agregar sobrenadantes de dos cepas de *G. stearothermophilus*.

Tiempo de incubación (h) de <i>B. cereus</i>	Tiempo de incubación (h) de <i>G. stearo.</i>	Cepas <i>G. stearo</i>	Valor D (min)					
			<i>B. cereus</i> 4810			<i>B. cereus</i> 14579		
			85°C	90°C	95°C	85°C	90°C	95°C
Control (esporas de <i>B. cereus</i>)			41.0 ± 5.5	23.2 ± 4.2	18.2 ± 4.3	12.8 ± 2.7	9.9 ± 2.0	5.7 ± 0.7
3	5	7953	33.9 ± 1.8	18.7 ± 5.1	17.1 ± 9.9	19.9 ± 3.0	14.8 ± 6.5	12.0±2.7*
		12980	12.5 ± 9.2*	11.6 ± 2.9	9.9 ± 5.0	17.5 ± 10.4	7.7 ± 0.7	7.1 ± 1.0
	10	7953	15.1 ± 0.9*	19.5 ± 0.4	21.3 ± 6.1	22.2 ± 7.0	6.7 ± 1.6	10.1 ± 0.5
		12980	15.5 ± 1.0*	22.4 ± 2.5	9.9 ± 0.3	1.7 ± 0.6	9.7 ± 2.4	6.0 ± 2.0
6	5	7953	44.6 ± 7.7	11.3 ± 3.9	7.2 ± 3.1	27.7 ± 11.7	7.4 ± 1.5	10.9±0.5*
		12980	28.3 ± 3.7	19.3 ± 4.4	12.3 ± 2.7	16.7 ± 2.6	6.1 ± 0.3	3.8 ± 0.4
	10	7953	20.7 ± 2.5*	13.4 ± 4.4	7.3 ± 1.6	32.1 ± 13.9	22.8 ± 20	5.1 ± 1.7
		12980	15.9 ± 2.5*	8.6 ± 2.2	5.1 ± 1.7	19.0 ± 2.5	7.2 ± 1.6	4.3 ± 0.1
12	5	7953	18.7 ± 7.8*	9.5 ± 3.3	8.1 ± 3.0	29.6 ± 8.5	6.7 ± 3.7	4.1 ± 0.7
		12980	28.4 ± 18.2	14.7 ± 10.9	8.6 ± 2.2	19.9 ± 4.0	9.5 ± 0.6	6.3 ± 3.3
	10	7953	22.1 ± 7.6*	20.7 ± 11.5	8.7 ± 3.2	52.4 ± 4.9*	8.5 ± 1.3	16.1±7.2*
		12980	20.5 ± 6.1*	80.8± 38.6*	16.1 ± 7.2	27.9 ± 7.7	5.5 ± 0.9	5.0 ± 1.4

*Diferencias significativas (p<0.05) fueron encontradas en comparación con el control negativo.

9. DISCUSIÓN

Las bacterias desarrollan respuestas de adaptación para poder sobrevivir en condiciones desfavorables (Hecker, et al. 1996; Usaga, et al. 2014; Farber y Brown, 1990). Los componentes intracelulares se han reportado como los principales responsables de esta respuesta, sin embargo, otros mecanismos de protección también se han relacionado con la secreción de exometabolitos (Rowbury, 2005). En nuestro trabajo confirmamos que bacterias como *B. cereus* son capaces de adquirir termotolerancia a condiciones letales (50°C) si previamente son sometidas a un pre-tratamiento térmico, lo cual concuerda con lo descrito previamente con Periagio et al. en el 2002.

Se ha reportado que durante una condición de estrés (por ejemplo altas temperaturas), bacterias como *E. coli*, secretan al medio metabolitos llamados Componentes Sensores Extracelulares (ESC) que se activan a Componentes Inductores Extracelulares (EIC), provocando como respuesta, termotolerancia a células no adaptadas (Rowbury, 2005). En nuestro trabajo al evaluar la respuesta en células vegetativas de *B. cereus* cuando estas eran combinadas con sobrenadantes de la misma especie y de *G. stearothermophilus*, se tuvieron dos comportamientos en función del tiempo de exposición a la temperatura letal, de 0 a 15 min, y después de eso (15 a 60 min). El efecto observado en las células de *B. cereus* podría ser debido tanto a compuestos intracelulares como extracelulares. Reportes anteriores han demostrado que los cultivos de *B. cereus* adquirieron tolerancia a 50°C cuando los cultivos recibieron previamente un choque térmico de 42°C (Periagio, et al. 2002; Lee, et al. 2011). La adquisición de esta termotolerancia puede deberse a diversos factores intracelulares como proteínas de choque térmico y nucleótidos como [p] ppGpp

(Arnosti, et al. 1986; Krüger, et al. 1994; Hecker, et al. 1996; Dalebroux, et al. 2010; Kanjee, et al. 2012). La adaptación de las bacterias a condiciones desfavorables depende de cómo las células reciben la señal y los diferentes mecanismos intracelulares y extracelulares que se desarrollan como mecanismos de defensa. La naturaleza de la señal puede ser sensada en forma primaria por un componente celular, una molécula pequeña, o un metabolito orgánico/inorgánico (Trent, et al. 1994). Se sabe que las respuestas intracelulares desempeñan un papel importante en la termotolerancia adquirida; aunque diferentes especies podrían utilizar diferentes estrategias para resistir esa condición desfavorable incluyendo combinaciones de HSP y/u otras macromoléculas (Trent, et al. 1994; Rowbury, 2005).

Se ha reportado que los miembros del género *Geobacillus* presentan alta variabilidad en sus respuestas metabólicas durante el crecimiento y cuando se encuentran en condiciones desfavorables, respondiendo con la producción de ciertas moléculas como antibióticos (bacteriocinas, Cuisine et al. 2009) y algunas enzimas termoestables tales como amilasas (Mamo, Gashe et al. 1999), proteasas (Hawumba et al. 2002), pululanases (Ben Messaoud et al. 2002), gelanasa (Derekova, et al. 2006), lipasas (Soliman, et al. 2007), carboxilesterasas (Liu, et al. 2007), y L-arabinosa isomerasas (Rhimi et al. 2007). Algunas de estas moléculas provocan efectos negativos en la interacción con otras células. Se ha reportado que las proteasas extracelulares de microorganismos termófilos desempeñan un papel importante para la hidrólisis de proteínas en ambientes libres de células, lo que permite a las células absorber y utilizar productos hidrolíticos. En *G. stearothermophilus* estas enzimas son responsables de la hidrólisis de las cadenas principales de peptidoglicanos (Stabnikova et al. 2004). Investigaciones previas han

sugerido que los metabolitos que participan en la adquisición de termotolerancia, son proteínas termolábiles (Srinivasan,1998), que pueden presentar cambios conformacionales debido a que la desnaturalización de las proteínas mediante calor, e inducir el rompimiento de puentes disulfuro, lo cual ocasiona pérdida de su función, y como consecuencia de la actividad termoprotectora (Murray, 1997).

Recientemente, se ha demostrado que el ppGpp juega un papel importante en la coordinación de la respuesta celular a condiciones ambientales adversas en *E. coli* (Balsalobre, 2011). Se tiene bien entendido el papel del ppGpp en la respuesta al estrés por baja de nutrientes, sin embargo al ser esta molécula un regulador global de la respuesta al estrés, se le relaciona con activaciones y desactivaciones de cascadas metabólicas importantes en la respuesta general al estrés (Magnusson, L. et al. 2005) Yang, 2003) sugirió que el ppGpp puede ser necesario en la expresión de genes implicados en la resistencia al calor. Además, se ha demostrado que el ppGpp aumenta sus niveles cuando *E. coli* es cambiado a una temperatura por encima de la de crecimiento (Vanbogelen, 1987). En este trabajo observamos este comportamiento en los cultivos de *B. cereus* cuando se sometieron al tratamiento subletal (42°C); sin embargo, cuando se cambió a la temperatura letal, la concentración del nucleótido tendió a disminuir. Es importante hacer notar que este compuesto tiene vida media corta, por lo que las concentraciones aumentan hasta alcanzar un efecto máximo y para después regresar a los niveles basales. Schumann (2003) describió que la respuesta al estrés es temporal y generalmente se manifiesta por un rápido incremento y por acumulación de proteínas del estrés u otros compuestos en los primeros minutos de aplicada la condición adversa, para que después de cierto tiempo, disminuir a niveles basales. El efecto observado en este trabajo en la concentración de

proteínas en las células es el esperado ya que la concentración de proteínas depende de la concentración celular y al encontrar disminución de la concentración celular en nuestros tratamientos, también pudo ser detectada una disminución de la cantidad de proteínas.

Se sabe que la termotolerancia en esporas de *C. perfringens* es afectada por la temperatura a la que se forman estas (García, et al. 1992), así como por choques térmicos aplicados principalmente en las primeras etapas del proceso de esporulación (Heredia, et al. 1997). En este estudio se analizó si *B. cereus* presentaba este comportamiento al ser influenciado por sobrenadantes pretratados y no-pretratados de *G. stearothermophilus*. En estos ensayos, se añadieron sobrenadantes de cultivos de *G. stearothermophilus* de 5 h y 10 h a cultivos de *B. cereus* de 3, 6 y 12 h de incubación. En varios trabajos se ha estudiado la resistencia al calor de las esporas de *G. stearothermophilus* (Periagio et al. 1998; Penna et al, 2003; Arriba Anurak et al. 2005; Head et al. 2008; Hassan y Ramaswamy, 2011), sin embargo no encontramos información sobre la inducción de termotolerancia en esporas por la adición de compuestos extracelulares. En estos ensayos encontramos en la mayoría de los tratamientos una disminución del valor de letalidad (D).

Se sabe que los factores más importantes que contribuyen a la resistencia al calor de las esporas incluyen un bajo contenido de agua, alto grado de mineralización y la temperatura óptima de crecimiento (Cazemier, 2001; Penna et al. 2003); la alteración o modificación de cualquiera de estos factores durante la formación de esporas influye directamente en su resistencia (Storz y Hengge 2010). Un ejemplo de esto es cuando las funciones de la membrana son afectadas por la interacción de moléculas extracelulares o por tratamientos físicos (como el calor), en donde la estructura de las esporas se daña provocando con esto una alteración de la presión osmótica, cambiando como

consecuencia, el grado de mineralización y las proteínas presentes en la capa externa haciendo cada vez más permeable a la espora y facilitando la pérdida de moléculas pequeñas o la entrada de moléculas que pueden afectar el desarrollo de la espora (Schaeffer, 1969; Storz y Hengge 2010).

Se ha reportado que *B. subtilis* presenta el mecanismo llamado canibalismo, en donde las células formadoras de endosporas secretan un factor esporulación (SKF, traducido como una proteína de 55 aa, con un péptido cíclico 26 aa en su sitio activo) que es capaz de matar a células circundantes (González-Pastor, Hobbs et al. 2003). En este trabajo esperábamos que aquellos tratamientos que recibieron los sobrenadantes en las primeras etapas de la esporulación presentaran mayor resistencia al calor que aquellas que lo recibieron en etapas tardías sin embargo no siempre encontramos este efecto. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Lee S. (2006) quien encuentra que las células pre-tratados en la última fase de esporulación fueron más resistentes que cuando la condición de estrés se aplicaban en las fases tempranas del proceso.

Podemos concluir en base a los resultados encontrados que la protección térmica de las células vegetativas se debió principalmente a factores intracelulares, y que la adición de sobrenadantes de *G. stearothermophilus* puede afectar la termotolerancia de *B. cereus*. Sin embargo, es importante continuar con el análisis de los mecanismos de adaptación y las interacciones entre especies.

10.CONCLUSIONES

- 1) Las células de *B. cereus* pre-tratadas a 42°C por 30 minutos, tienen mayor capacidad de sobrevivir a la temperatura letal de 50°C.
- 2) La fracción de 30kda de *B. cereus* 4810 mostró tener efecto termoprotector.
- 3) Los sobrenadantes de células de *G. stearothermophilus* con o sin pre-tratamiento fueron capaces de inducir termotolerancia a 50°C a células de *B. cereus* que no fueron sometidas a ningún tipo de estrés.
- 4) Los niveles de ppGpp aumentaron durante el pre-tratamiento en células de *B. cereus*, sin embargo disminuyeron durante la exposición a la temperatura letal.
- 5) Los sobrenadantes de células en esporulación de *G. stearothermophilus* fueron capaces de provocar la formación de esporas termorresistentes de *B. cereus*.

11.BIBLIOGRAFÍA

- Abranches J, Martinez AR, Kajfasz JK, Chavez V, Garsin DA, Lemos JA. 2009. The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 191:2248–2256.
- Arnosti D, Singer V, Chamberlin M. 1986. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 168: 1243-1249.
- Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, Vassylyeva MN, Hosaka T, Ochi K, Vassylyev DG. 2004. Structural Basis for Transcription Regulation by Alarmone ppGpp. *Cell* 117:299-305.
- Asha SS, Bhagyalakshmi KK. 2011. Heat Shock Proteins. *Journal of Pharmacy Research* 4:3829-3832.
- Auffray Y, Lecesne E, Hartke A, Boutibounes P. 1995. Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Current Microbiology* 30:87-91.
- Balsalobre C. 2011. Concentration matters!! ppGpp, from a whispering to a strident alarmone. *Molecular Microbiology* 79: 827-829.
- Beaman TC, Gerhardt P. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplasdehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Applied Environmental Microbiology* 52 :1242-1246.
- Benson AK, Haldenwang WG. 1993. The σ^B –dependent promoter of *Bacillus subtilis* sigB operon is induced by heat shock. *Journal of Bacteriology* 175:1929-1935.

- Bochner BR, Lee PC, Wilson SW, Cutler CW, Ames BN. 1984. AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. *Cell* 37:225-232.
- Brown K.L. 2000. Control of bacterial spores. *Britani Medical Bulletin* 56:158-171.
- Browne N, Dowds BCA. 2001. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 91: 1085–1094.
- Burges SA, Lindsay D, Flint SH. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144: 215-225.
- Cazemier A, Wagenaars S, Ter Steeg P. 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90: 761-770.
- Condon C, Squires C, Squires CL. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiology Reviews* 59: 623–645.
- Dalebroux, ZD, Svensson SL, Gaynor EC, Swanson MS. 2010. ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 171-199.
- Davydova OK, Deryabin DG, Nikiyan AN, El'-Registan GI. 2005. Mechanisms of Interaction between DNA and Chemical Analogues of Microbial Anabiosis Autoinducers. *Microbiology* 74:533-541.
- Davydova OO, Deryabin DD, El'-Registan GG. 2007. IR spectroscopic research on the impact of chemical analogues of autoregulatory d1 factors of microorganisms on structural changes in DNA. *Microbiology* 76: 266-272.

- Delumeau O, Dutta S, Brigulla M, Kuhnke G, Hardwick SW, Volker U, Lewis RJ. 2004. Functional and structural characterization of rsbu, a stress signaling protein phosphatase 2c. *Journal of Biological Chemistry* 279: 40927-40937.
- Den Besten HW, Mataragas M, Moezelaar R, Abee T, Zwietering MH. 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5884-5894.
- El-Registan GI, Mulyukin AL, Nicolaev YA, Stepanenko IY, Kozlova AN, Martirosova EI, Shanenko EF, Strakhovskaya MG, Revina AA. 2005. The role of microbial low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzens) in resistance of microorganisms to radiation and heat shock. *Adv Space Res* 36 :1718-1728.
- El-Registan GI, Mulyukin AL, Nicolaev, YA, Suzina, NE, Galchenko VF, Duda VI. 2006. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms. *Microbiology* 74 :533-541.
- Elsholz AK, Michalik S, Zuhlke D, Hecker M, Gerth U. 2010. CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *EMBO Journal* 29:3621–3629.
- Farber, JM, Brown BF. 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1584-1587
- Fehr S, Richter D. 1981. Stringent response of *Bacillus stearothermophilus*: evidence for the existence of two distinct guanosine 3',5'-polyphosphate synthetases. *Journal of Bacteriology* 145:68-73.

- Ferenci T, Galbiati HF, Betteridge T, Phan K, Spira B. 2011. The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in *Escherichia coli*. BMC Microbiology 11:62-68.
- García-Alvarado JS, Labbe RG, Rodriguez MA. 1992. Sporulation and enterotoxin production of *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43C. Applied and Environmental Microbiology 58: 1411–1414.
- Georget E, Kapoor S, Winter R, Reineke K, Song Y, Callanan M, Ananta E, Heinz V, Mathys A. 2014. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure. Food Microbiology 41: 8-18.
- Ghosh S, Pengfei Z, Yong-qing L, Setlow P. 2009. Superdormant spores of *bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. Journal of Bacteriology 191:5584-5591.
- Gómez EC. 2006. Respuesta Celular al estrés. Revista Latinoamericana de Microbiología 48:162-172.
- Griffiths MW. 1995. Foodborne illness caused by *Bacillus* spp. other than *B. cereus* and their importance to the dairy industry. International Dairy Federation Bull, 302: 3-6.
- Gunasekera TS, Csonka LN, Paliy O. 2008. Genome-wide transcriptional responses of *escherichia coli* k-12 to continuous osmotic and heat stresses. Journal of Bacteriology 10: 25-28.
- Head DS, Cenkowski S, Holley R, Blank G. 2008. Effects of superheated steam on *Geobacillus stearothermophilus* spore viability. Journal of Applied Microbiology 104: 1213–1220.

- Hecker M, Pané-Ferré J, Voelker U. 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram positive bacteria. *Annual Review Microbiology* 61:215-236.
- Hecker M, Völker U. 1990. General stress protein in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 197-214.
- Hecker M, Schumann W, Völker U. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 19(3): 417-428.
- Helmann JD, Wu MF, Kobel PA, Gamo FJ, Wilson M. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *Journal of Bacteriology* 183: 7318–7328.
- Hengge-Aronis R. 2002. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ^S -selective?. *Current Opinion in Microbiology* 5:291-295.
- Heredia NL, García GA, Luévanos RL, Ronald G, García-Alvarado JS. 1997. Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type a by sublethal heat shock. *Journal of Food Protection* 60:998-1000.
- Heredia N, Ybarra P, Hernández C, García S. 2009. Extracellular protectants produced by *Clostridium perfringens* cells at elevated temperature. *Letters Applied Microbiology* 48 :133-139.
- Heredia NL, Labbé RG, García-Alvarado JS. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxin production, and protein synthesis by *Clostridium perfringens* type a following heat shock. *Journal of Food Protection* 61: 1143-1147.

- Hornstra LM, Beek AT, Smelt JP, Kallemeijn WW, Brul S. 2009. On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a 'systems' analysis approach of bacterial spore outgrowth. *International Journal of Food Microbiology* 134:9–15.
- Il'inskaya ON, Kolpakov AI, Zelenikhin PV, Kruglova ZF, Choidash BB, Doroshenko EV, El'-Registan GI. 2002. The effect of anabiosis autoinducers on the bacterial genome. *Microbiology* 71:164-168.
- Kanjee U, Ogata K, Houry WA. 2012. Direct binding targets of the stringent response alarmone (p) ppGpp. *Molecular Microbiology* 85: 1029-1043.
- Koch B, Kilstrup M, Vogensen FK, Hammer K. 1998. Induced levels of heat shock proteins in a DnaK mutant of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 180: 3873-3881.
- Konanykhina IA, Shanenko EF, Loiko NG, Nikolaev YA, El-Registan GI. 2008. Regulatory effect of microbial alkyloxybenzenes of different structure on the stress response of yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44:518-522.
- Kort R, O'Brien AC, van Stokkum IM, Oomes SM, Crielaard W, Hellingwerf KJ, Brul S. 2005. Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. *Applied & Environmental Microbiology* 71:3556-3564.
- Kruger E, Volker U. 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *Journal of Bacteriology*, 176:3360-3365.
- Lee JK, Movahedi S, Harding SE, Waites WM. 2003. The effect of acid shock on sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Applied Microbiology* 94: 184–190.

- Lee JK, Movahedi S, Harding SE, Mackey BM, Waites WM. 2007. Effect of small, acid-soluble proteins on spore resistance and germination under a combination of pressure and heat treatment. *Journal of Food Protection* 70:2168-2171.
- Lee S, Sim, SJ. 2006. Increased heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores heat-shocked during sporulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(4), 633.
- Li J-s, Bi Y-t, Dong C, Yang J-f, Liang W-d. 2011. Transcriptome Analysis of Adaptive Heat Shock Response of *Streptococcus thermophilus*. *PLoS ONE* 6: 25777
- Loiko NN, Mulyukin AA, Kozlova AA, Kaplun AA, Sorokin VV, Borzenkov II, El'-Registan GG. 2009. Effect of, hexylresorcinol, a chemical analogue of bacterial anabiosis autoinducers on the stability of membrane structures. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45:162-168.
- Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 13(5), 236-242.
- Mechold U, Potrykus K, Murphy H, Murakami KS, Cashel M. 2013. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 41(12), 6175-6189.
- Melly E, Setlow P. 2001. Heat shock proteins do not influence wet heat resistance of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*. 183:779–784.
- Mogk A, Homuth G, Scholz C, Kim L, Schmid FX, Schumann W. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal* 16:4579–4590.

- Movahedi S, William Waite. 2000. A Two-Dimensional Protein Gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *Journal of Bacteriology* 182:4758-4762.
- Murata M, Fujimoto H, Nishimura K, Charoensuk K, Nagamitsu H, Raina S, Yamada M. 2011. Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. *Plos ONE Journal* 6:1-9.
- Nadratowska-Wesołowska B, Słomińska-Wojewódzka M, Łyżeń R, Węgrzyn A, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G. 2010. Transcription regulation of the *Escherichia coli* *pcnB* gene coding for poly(A) polymerase I: roles of ppGpp, DksA and sigma factors. *Molecular Genetics and Genomics* 284:289-305.
- Nazina T, Tourova T, Poltarau A, Novikova E, Grigoryan A, Ivanova A, Lysenko A, Petrunyaka V, Osipov G, Belyaev S. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:433-446.
- Nikolaev YA, Loiko NG, Stepanenko IU, Shanenko EF, Martirosova EI, Plakunov VK, El-Registan GI. 2008. Changes in physicochemical properties of proteins, caused by

- modification with alkylhydroxybenzenes. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44:143-150.
- Nikolaev YA. 1997. Comparative study of two extracellular protectans secreted by *escherichia coli* cells at elevated temperatures. *Microbiology* 66:661-665.
- OCHI K. 1986. Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *Journal of general microbiology*, 132(9), 2621-2631.
- O'Connor K, Fletcher SA, Csonka LN. 2009. Increased expression of Mg²⁺ transport proteins enhances the survival of *Salmonella enterica* at high temperature. *proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 41: 17522-17527.
- Olivier SA, Bull MK, Stone G.G, van Diepenbeek RJ, Kormelink FF, Jacops LL, Chapman BB. 2011. Strong and consistently synergistic inactivation of spores of spoilage-associated *bacillus* and *geobacillus* spp. by high pressure and heat compared with inactivation by heat alone. *Applied and Environmental Microbiology* 77:2317-2324.
- Periago PM, van Schaik W, Abee T, Wouters JA. 2002. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3486-3495.
- Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Volker U, Hecker M. 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal Of Bacteriology* 183:5617-5622.

- Pokusaeva K, Kuisiene N, Jasinskyte D, Rutiene K, Saleikiene J, Chitavichius D. 2009. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. Central European Journal of Biology 4: 196-203.
- Price CW, Fawcett P, C  r  monie H, Su N, Murphy C K, Youngman P. 2001. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 41: 757–774.
- Rossi, M, Guagliardi A. 2009. Heat shock response in extremophilic microorganism. In Extremophiles (eds.) Gerday C, Glansdorff N. pp. 282-293. Italy :EOLSS.
- Rowbury RJ. 2000. Killed Cultures of *Escherichia coli* can protect living organisms from acid stress. Microbiology Comment 146:2343-2348.
- Rowbury RJ. 2001. Cross-Talk involving extracellular sensors and extracellular alarmones gives early warning to unstressed *Escherichia coli* of impending lethal chemical stress and leads to induction of tolerance responses. Journal of Applied Microbiology 90: 677-695.
- Rowbury RJ. 2005. Intracellular and extracellular components as bacterial thermometers, and early warning against thermal stress. Science Progress 88: 71-99.
- .Schaeffer P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotoxins. Bacteriological Reviews 33: 48.
- Scheldeman P, Herman L, Foster S, Heyndrickx. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. Journal of Applied Microbiology 101:542-555.

- Schön U, Schumann W. 1993. Molecular cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *groES* operon from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal Bacteriology* 1175:2465–2469.
- Schumann W. 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* 8:207–217.
- Segal G, Ron EZ. 1998. Regulation of Heat-Shock Response in Bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851: 147–151.
- Setlow PP. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101:514-525.
- Shenhar Y, Rasouly A, Biran D, Ron EZ. 2009. Adaptation of *Escherichia coli* to elevated temperatures involves a change in stability of heat shock gene transcripts. *Environmental Microbiology* 11:2989-2997.
- Solis, LY. 2003. Adquisición de termotolerancia en células de *Bacillus cereus* por sobrenadantes sometidos a un choque térmico subletal. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Storz G, Hengge R. 2010. Bacterial stress responses. American Society for Microbiology Press. Editorial, paginas, pais
- Streips UN, Polio FW. 1985. Heat shock proteins in bacilli. *Journal of Bacteriology* 162:434–437.

- Takahashi K, Kasai K, Ochi K. 2004. Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4320-4324.
- Teixeira P, Castro H, Kirby R. 1994. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* 18: 218–221.
- Tomoyasu N, Kozo O, Koji K, Kosaku T, Hiroyuki A, Takeshi H. 2006. Physiological Analysis of the Stringent Response Elicited in an Extreme Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophiles*. *Journal of Bacteriology* 188: 9-17.
- Usaga J, Worobo RW, Padilla-Zakour OI. 2014. Effect of acid adaptation and acid shock on thermal tolerance and survival of *Escherichia coli* O157: H7 and O111 in apple juice. *Journal of Food Protection* 77: 1656-1663.
- Vorob'eva LL, Khodzhaev EE, Ponomarev GG. 2008. Protective effect of extracellular protein metabolite of *Luteococcus japonicus* subsp. casei on cells subjected to heating and UV irradiation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44:38-41.
- Vorob'eva, LI. 2004. Stressors, Stress Reactions, and Survival of Bacteria: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40:217-224.
- Wu L, Welker NE. 1991. Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *Journal of Bacteriology*. 173:4889–4892.

12. TRABAJOS PRESENTADOS EN FOROS INTERNACIONALES

Gómez-Govea Mayra, García S. Davila-Aviña J. and Heredia N. Variation of ppGpp (Guanosine Tetraphosphate) Levels in *Bacillus cereus* in Response to Thermal Stress. International Meeting of American Society of Microbiology 2014 (Boston, Massachusetts May 17 to 21 2014)



K-2691

Variation of ppGpp (Guanosine Tetraphosphate) Levels in *Bacillus cereus* in Response to Thermal Stress.

M. Gomez-Govea, S. Garcia, J. Davila, N. Heredia;
Univ. Autonoma de Nuevo Leon, San Nicolas NL, Mexico

The ppGpp (guanosine tetraphosphate) is a nucleotide that serves as a global regulator in the expression of bacterial genes and plays a key role in cellular responses to adverse conditions. It seems that when there is an increase in the temperature, bacteria adjust their basal levels of ppGpp to regulate the level of RNA synthesis. The aim of this study was to determine and quantify ppGpp in vegetative cells of *Bacillus cereus* exposed to a sub-lethal heat shock. Cultures of vegetative cells of *B. cereus* were exposed to 42 °C for 30 min (sublethal shock) followed by exposure to a lethal temperature (50 °C), and subsequently production of ppGpp and bacterial survival were determined. ppGpp was extracted from 200 ml-cultures exposed to sub-lethal shock, as well as from controls (w/o sub-lethal shock) both subjected to lethal temperature. Samples were centrifuged, freeze dried and resuspended in 1M formic acid (bacterial final concentration of 20 mg/mL). The nucleotide was precipitated with 1M LiCl, followed by addition of ethanol (96%) and 1M K₂HPO₄. The precipitate was washed with 70 % cold ethanol, dried by lyophilization and dissolved with cold mQ water. The nucleotide was detected and quantified by HPLC[[Unable to Display Character: –]]DAD. Protein was determined by the Bradford method. Our results indicated that cells exposed to a sub-lethal heat shock survived more (1 log CFU/mL) than the control cells. No significant differences ($P < 0.05$) in nucleotide concentration existed during the whole time of treatments; however, a significant increase (52.86 pmol/mg dry weight) in ppGpp was observed during the first 15 min of treatment at lethal temperatures in the cells previously subjected to sub-lethal shock. No changes were observed in protein concentration between treatments, indicating similar cell concentrations. We conclude that an increase in the levels of nucleotide (ppGpp) during the initial treatment to lethal temperature was observed in cells with a previous sub-lethal shock, which could be involved in protecting the cell to lethal temperatures through activation of intracellular responses.

13.RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Mayra Alejandra Gómez Govea

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: ACTIVIDAD TERMOPROTECTORA DE EXOMETABOLITOS EN
MICROORGANISMOS ESPORULADOS

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en San Luis Potosí, S.L.P. el 14 de abril de 1984, hija de
María Alejandrina Govea Ruiz y Mario Gómez Nuñez

Educación: Egresada de la Universidad de San Luis Potosí, grado obtenido
Químico Fármaco Biólogo en 2007, egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León
grado obtenido Maestro en Ciencias especialidad en Microbiología en el 2009.

Experiencia Profesional: Profesor en el curso teórico-práctico: Microbiología de
Alimentos, Toxicología de Alimentos y Anatomía y Fisiología en la UASLP, Fisiología
de Microorganismos, Diagnostico Microbiológico Moderno, Seguridad en el Laboratorio
Químico, Biología y Microbiología en la UANL Facultad de Ciencias Biológicas desde
2012.